



# Interactions entre levures *Saccharomyces cerevisiae* et non-*Saccharomyces* en vinification.: Incidence de facteurs de l'environnement.

Laura Chasseriaud

## ► To cite this version:

Laura Chasseriaud. Interactions entre levures *Saccharomyces cerevisiae* et non-*Saccharomyces* en vinification.: Incidence de facteurs de l'environnement.. Ingénierie des aliments. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0309 . tel-01255422

**HAL Id: tel-01255422**

**<https://theses.hal.science/tel-01255422>**

Submitted on 13 Jan 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ : ŒNOLOGIE

Par Laura CHASSERIAUD

*Née le 02/11/1989 à Talence (33)*

**Interactions entre levures *Saccharomyces cerevisiae* et  
non-*Saccharomyces* en vinification.  
Incidence de facteurs de l'environnement.**

Sous la direction de : Marina BELY

Soutenue le 9 décembre 2015

Membres du jury :

Mme TAILLANDIER Patricia, Professeur à l'Université de Toulouse.....	Présidente
Mme SICARD Delphine, Directrice de Recherche à l'INRA de Montpellier.....	Rapporteur
M. ROZES Nicolas, Professeur à l'Université de Tarragone.....	Rapporteur
M. COLONNA-CECCALDI Benoit, Responsable R&D produits Pernod-Ricard...	Examineur
Mme COULON Joana, Responsable R&D Microbiologie BioLaffort.....	Invitée
Mme BELY Marina, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux.....	Directrice de thèse

## **Titre : Interactions entre levures *Saccharomyces cerevisiae* et non-*Saccharomyces* en vinification. Incidence de facteurs de l'environnement.**

### **Résumé :**

Les levures non-*Saccharomyces*, naturellement présentes dans les moûts, peuvent impacter positivement ou négativement la qualité des vins. Depuis quelques années l'utilisation de cultures mixtes, comme starters, associant une souche de *Saccharomyces cerevisiae* et une souche d'une autre espèce est proposée aux œnologues. C'est le cas du couple *S. cerevisiae*/*Torulaspora delbrueckii*. L'étude des interactions entre la souche *T. delbrueckii* Zymaflore Alpha et *S. cerevisiae* Zymaflore X5, de la société Laffort, a été réalisée. Les fermentations alcooliques ont été effectuées dans un réacteur à double compartiment permettant la séparation physique des levures tout en conservant l'homogénéité du milieu de culture. Les résultats ont mis en évidence que la séparation impacte la croissance des 2 souches suggérant l'existence d'interactions de type cell-cell contact entre ces 2 souches. Si une grande majorité de praticiens utilise désormais les levures sélectionnées, certains ont fait le choix de favoriser les populations autochtones de levures *S. cerevisiae* et de levures non-*Saccharomyces*. L'incidence de deux facteurs de l'environnement a été étudié sur un mélange de 5 espèces de non-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp., *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*) et de 2 souches de *S. cerevisiae* (une à phase de latence courte, une à phase de latence longue) en cultures pures et en mélange. L'inoculation de la souche de *S. cerevisiae* à phase de latence longue dans un moût saturé en CO<sub>2</sub> permet de stimuler les levures non-*Saccharomyces* d'intérêt (*T. delbrueckii*/*P. kluyveri*) tout en inhibant les espèces indésirables (*H. uvarum*, *C. zemplinina*).

**Mots clés :** Vin, non-*Saccharomyces*, interactions, CO<sub>2</sub>, lipides

---

## **Title : Interactions between *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. Impact of environmental factors.**

### **Abstract :**

Non-*Saccharomyces* yeasts, naturally found in grape must, can impact wine quality positively or negatively. In recent years, the use of mixed cultures as starters (association of *S. cerevisiae* species and other species) such as the couple *Saccharomyces cerevisiae*/*Torulaspora delbrueckii* is proposed to winemakers. Interactions between these two species have been studied with two commercial strains, *T. delbrueckii* Zymaflore Alpha and *S. cerevisiae* Zymaflore X5 (Laffort). Alcoholic fermentations were carried out in a fermentor with double compartment allowing a physical separation of yeasts and preserving the homogeneity culture medium. The results highlighted that the physical separation impacts the growth of both strains, suggesting interactions of type cell-cell contact between these two strains. If a large majority of winemakers use selected yeasts strains, some of them chose to favour native yeasts, *S. cerevisiae* species and non-*Saccharomyces* species. The impact of two environmental factors was investigated on 5 non-*Saccharomyces* species (*T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp., *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*) and two strains of *S. cerevisiae* (one with short fermentation lag phase, one with long fermentation lag phase), in pure and mixed cultures. The inoculation with *S. cerevisiae* with a long fermentation lag phase in a must saturated with CO<sub>2</sub> allowed to stimulate some of non-*Saccharomyces* which present an interest in winemaking (*T. delbrueckii*/*P. kluyveri*) and inhibit the undesirable ones (*H. uvarum*, *C. zemplinina*).

**Keywords :** Wine, non-*Saccharomyces*, interactions, CO<sub>2</sub>, lipids

---

## **Unité de recherche**

Université de Bordeaux, ISVV, EA 4577, Unité de Recherche Œnologie.  
33140 Villenave d'Ornon

# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier Marina BELY, Maître de Conférence à l'Université de Bordeaux, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci de m'avoir offert de telles conditions de travail, pour vos conseils, votre disponibilité et votre confiance et votre soutien durant ces 3 ans.

J'exprime ma profonde gratitude à Luc LAFFORT d'avoir accepté de financer cette thèse, à Joana COULON, Responsable R&D Microbiologie, et Virginie MOINE, Directrice Scientifique, de la société BIOLAFFORT, pour leur aide et leur soutien durant ce travail.

Ce travail a été effectué au sein de l'unité de recherche Œnologie de l'ISVV dirigée par le Professeur Philippe DARRIET et de l'équipe Microbiologie du raisin et du vin dirigée par le Professeur Patrick LUCAS. Je les remercie pour leur accueil au sein de leur laboratoire.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail de thèse : Nicolas ROZES, Professeur à l'Université de Tarragone, Delphine SICARD, Directrice de recherche à l'INRA de Montpellier, Patricia TAILLANDIER, Professeur à l'Université de Toulouse et Benoit COLONNA-CECCALDI, Directeur de recherche au sein du groupe PERNOD-RICARD.

Je voudrais remercier particulièrement Warren ALBERTIN, Maître de Conférences à l'Institut Polytechnique de Bordeaux, pour son soutien et surtout son aide lors de l'analyse de mes données. Merci pour les dizaines de scripts sans lesquels je n'y serais pas arrivée, la relecture de cette thèse, les manips du week-end et du soir. Et aussi pour les pauses chocolat...

Je remercie également Cécile MIOT-SERTIER, technicienne au sein de l'unité de recherche Œnologie, pour son aide, sa disponibilité et sa bonne humeur ainsi que Cécile THIBON, Ingénieur de Recherche, pour son aide lors des analyses des thiols volatils.

Je souhaite aussi remercier Philippe MARULLO, Chercheur de la société Laffort détaché à l'ISVV, pour son aide et ses conseils. Et ses cascades. Je voudrais également remercier Nerea ITURMENDI, Responsable R&D Chimie et Colloïdes au sein de la société Laffort, ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire SARCO, en particulier Philippe LOUAZIL et Laetitia ETOURNEAU pour les analyses réalisées et la préparation de milieux de culture.



Les analyses de la composition lipidique cellulaires ont été effectuées au sein du pôle Lipidome du Laboratoire de Biogenèse Membranaire de l'INRA de Bordeaux. Je remercie Jean-Jacques BESSOULE, directeur du laboratoire, d'avoir accepté que je réalise mes essais dans son laboratoire, Sébastien MONGRAND, Directeur Scientifique, et Laëtitia FOUILLEN, Ingénieur de Recherche, pour leur encadrement. Je remercie également Jérôme JOUBES, Maître de Conférences, pour ses conseils.

J'adresse mes sincères remerciements à Jean-Christophe BARBE, Maître de Conférences à Bordeaux Sciences Agro, et Margaux CAMELEYRE, étudiante en thèse, pour l'analyse des esters.

Je remercie sincèrement le personnel de l'UMR de Génétique Végétale du Moulon, Thierry BALLIAU, Michel ZIVY et Mélisande BLEIN-NICOLAS d'avoir effectué l'analyse protéomique de mes échantillons.

Je remercie les Vignobles Ducourt (Jérémy DUCOURT) de m'avoir fourni les moûts nécessaires à la réalisation de mes différents essais.

Merci à mes stagiaires, dont les travaux m'ont permis de compléter mes résultats : Charline, Gabriel, Cédric, Jimmy et Lucille.

Je remercie le personnel du hall de technologie, Martine MIETTON-PEUCHOT, Rémy GHIDOSSI, Fabrice MEUNIER, Philippe RENAULT et Sami YAMMINE pour leur aide. Merci également au personnel de Microflora, Julie MAUPEU et Geoffrey BOURBON pour les analyses qu'ils ont réalisés.

Je voudrai également remercier Aline LONVAUD pour ses conseils tout au long de cette thèse. Je remercie également Lucie DUTILH, Margaux BERNARD, Maria MARTI et Emilien PELTIER pour leur soutien, les fous rires et tous les bons moments.

Enfin, merci à mes parents, mon frère (notre technicien informatique préféré), Guillaume, à toute ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenue.

# Table des matières

---

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Etude bibliographique.....</b>	<b>4</b>
1 Les levures en œnologie .....	4
1.1 Origine des levures du moût .....	4
1.1.1 Vigne et baie de raisin .....	4
1.1.2 Matériel et environnement du chai.....	5
1.2 Dynamique et diversité des populations de levures au cours de la fermentation alcoolique	5
1.3 Méthodes d'études des populations de levures .....	7
1.3.1 Techniques culturales et microscopiques.....	7
1.3.2 Techniques de biologie moléculaire .....	7
2 Interactions au cours de la fermentation alcoolique.....	9
2.1 Les grands types d'interactions.....	9
2.2 Interactions entre les levures au cours de la fermentation alcoolique.....	10
2.2.1 Mécanismes mis en jeu au cours de la vinification .....	10
2.2.2 Interactions <i>S. cerevisiae</i> / <i>S. cerevisiae</i> .....	10
2.2.3 Interactions <i>S. cerevisiae</i> /non- <i>Saccharomyces</i> .....	11
2.2.3.1 Cell-cell contact .....	11
2.2.3.2 Implication de composés toxiques .....	12
2.2.3.3 Limitation nutritionnelle, compétition pour substrat .....	15
3 Propriétés des levures non- <i>Saccharomyces</i> fréquemment isolées des moûts en fermentation .....	16
3.1 <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	16
3.2 <i>Candida zemplinina</i> .....	18
3.3 <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	19
3.4 <i>Pichia kluyveri</i> .....	20
3.5 <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....	20
3.5.1 Caractéristiques de l'espèce <i>M. pulcherrima</i> .....	20
3.5.2 Connaissances actuelles sur l'activité protéasique de <i>Metschnikowia pulcherrima</i> et intérêts en œnologie .....	21
3.5.2.1 La casse protéique et les traitements .....	21
3.5.2.2 Méthodes existantes de mesure de l'activité protéolytique.....	22
4 Impact de la composition en lipides du moût sur le développement des levures .....	23
4.1 Métabolisme des lipides chez la levure .....	24
4.1.1 Les acides gras .....	24

4.1.2	Formation des lipides neutres et phospholipides.....	25
4.1.3	Stérols .....	28
4.1.4	Sphingolipides.....	29
4.2	Catabolisme .....	30
4.3	Lipides et fermentation alcoolique .....	30
5	Impact du CO <sub>2</sub> dissout .....	32
5.1	Mécanisme d'inhibition par le CO <sub>2</sub> .....	32
5.2	Impact du CO <sub>2</sub> sur les espèces de levure retrouvées en oenologie .....	34
<b>Partie 1 : Etude des interactions entre <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i> .....</b>		<b>35</b>
<b>Matériels et méthodes.....</b>		<b>36</b>
1	Matériel biologique .....	36
2	Fermentations alcooliques .....	36
2.1	Moût .....	36
2.2	Pré-cultures (levains) .....	37
2.3	Détermination de la population et de la viabilité par cytométrie en flux.....	37
2.4	Fermentations en fermenteur double compartiment .....	38
2.5	Inoculation et modalités .....	41
3	Suivi des populations.....	42
3.1	Milieu YPD solide : levures totales.....	42
3.2	Milieu YPD solide + cycloheximide : <i>Torulaspora delbrueckii</i> .....	43
4	Contrôles d'implantation.....	43
4.1	Extraction d'ADN.....	43
4.2	Amplification d'ADN par PCR .....	44
4.3	Electrophorèse sur gel d'agorose.....	44
5	Analyses des composés en fin de fermentation .....	44
5.1	Analyse des thiols volatils .....	44
5.2	Analyse des esters.....	46
5.3	Analyses physico-chimiques classiques : éthanol, sucres, acidité volatile, dioxyde de soufre (SO <sub>2</sub> ), glycérol, azote assimilable.....	47
6	Calcul des paramètres de croissance et de fermentation alcoolique - Analyse statistique	48
6.1	Calcul des paramètres.....	48
6.2	Analyse statistiques .....	49
<b>Résultats et Discussion .....</b>		<b>50</b>
1	Effet densité .....	51
2	Etude des interactions entre <i>S. cerevisiae</i> et <i>T. delbrueckii</i> .....	55

2.1	Cinétiques de fermentation alcoolique.....	55
2.2	Suivi des populations .....	57
2.3	Analyses des composés aromatiques et physico-chimiques en fin de fermentation .....	59
2.3.1	Thiols volatils .....	59
2.3.2	Esters .....	61
2.3.3	Production d'acidité volatile.....	64
3	Discussion .....	66

## **Partie 2 : Incidence de facteurs de l'environnement sur le développement des levures non-Saccharomyces..... 74**

### **Matériels et méthodes..... 75**

1	Matériel biologique .....	75
2	Construction des souches de <i>S. cerevisiae</i> .....	76
2.1	Stratégie.....	76
2.1.1	Obtention de souches de <i>S. cerevisiae</i> fluorescentes.....	76
2.1.2	Obtention d'une souche de <i>S. cerevisiae</i> à phase de latence longue.....	76
2.2	Extraction d'ADN.....	77
2.3	Amplification des cassettes.....	78
2.3.1	Cassette YFP.....	78
2.3.2	Cassette KAN .....	78
2.4	Transformation de la souche commerciale X5.....	79
2.4.1	Précipitation des cassettes et dosage d'ADN .....	79
2.4.2	Protocole de transformation .....	80
2.5	Mesure de la fluorescence par cytométrie de flux et sélection des clones .....	81
2.5.1	Mesure de la fluorescence émise lors de l'expression du gène codant pour la protéine YFP .....	81
2.5.2	Sélection des clones.....	82
2.5.2.1	Souche de <i>S. cerevisiae</i> YFP+.....	82
2.5.2.2	Souche de <i>S. cerevisiae</i> YFP+ à phase de latence longue.....	82
3	Fermentations alcooliques .....	83
3.1	Moût .....	83
3.2	Pré-cultures (levains) .....	84
3.3	Fermentations en bioréacteurs 125 mL.....	85
3.3.1	Saturation des fermenteurs en CO <sub>2</sub> et en azote .....	85
3.3.2	Supplémentation du moût avec un produit commercial dérivé de levure.....	86
3.3.3	Essais en culture pure.....	87
3.3.4	Essais en culture mixte .....	87
4	Suivi des populations .....	87

4.1	Cytométrie de flux.....	87
4.2	Milieu gélosé WL.....	87
5	Contrôles d'implantation.....	88
6	Activité protéolytique et dosage des protéines du raisin.....	89
6.1	Suivi de l'activité protéolytique .....	89
6.2	Dosage des protéines du raisin .....	90
7	Analyse de la composition lipidique des cellules de levures et du moût .....	90
7.1	Extraction lipidique .....	90
7.1.1	Cellules.....	90
7.1.2	Moût .....	91
7.2	Analyse des acides gras et stérols .....	91
7.2.1	Acides gras .....	91
7.2.2	Stérols .....	92
8	Analyses courantes et thiols volatils en fin de fermentation .....	93
9	Calcul des paramètres de croissance et de fermentation alcoolique – Analyses statistiques.....	93
9.1	Calcul des paramètres.....	93
9.2	Analyse statistique .....	94
	<b>Résultats et Discussion .....</b>	<b>95</b>
1	Etudes préliminaires.....	96
1.1	Choix des souches.....	96
1.1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	96
1.1.2	Levures non- <i>Saccharomyces</i> .....	100
1.1.2.1	<i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Candida zemplinina</i> et <i>Torulaspora delbrueckii</i>	100
1.1.2.2	<i>Metschnikowia</i> spp.....	100
1.2	Choix des produits commerciaux utilisés.....	104
1.3	Etude préliminaire sur l'impact du CO <sub>2</sub> (dioxyde de carbone) du N <sub>2</sub> (diazote).....	106
2	Impact de la saturation en CO <sub>2</sub> et de la supplémentation du moût avec les produits commerciaux.....	109
2.1	Cultures pures .....	110
2.1.1	Impact sur les cinétiques de croissance et de fermentation .....	110
2.1.1.1	Impact de la saturation en CO <sub>2</sub> .....	112
2.1.1.2	Impact de la supplémentation du moût avec les produits commerciaux A, C et F 112	
2.1.2	Impact de la saturation en CO <sub>2</sub> et de la supplémentation du produit F sur la composition lipidiques des cellules.....	115

2.1.2.1	Acides gras.....	116
2.1.2.2	Stérols.....	118
2.1.2.3	Corrélations entre la composition en lipides et les paramètres de croissance et de fermentation	120
2.1.3	Conclusion des essais réalisés en culture pure .....	122
2.2	Mélange d'espèces non- <i>Saccharomyces</i> .....	122
2.2.1	Effet de la saturation en CO <sub>2</sub> et de la supplémentation du moût avec le produit F sur un mélange d'espèces non- <i>Saccharomyces</i> .....	123
2.2.2	Effet de l'inoculation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	125
2.2.3	Effet de la saturation du moût en CO <sub>2</sub> et/ou du produit F sur le mélange de levures non- <i>Saccharomyces</i> et <i>S. cerevisiae</i> .....	129
2.2.3.1	Cinétiques de fermentation alcoolique .....	130
2.2.3.2	Cinétiques de croissance .....	131
2.2.3.3	Thiols volatils .....	140
2.2.3.4	Acidité volatile .....	141
2.3	Discussion.....	142
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>		<b>150</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>153</b>
<b>Annexes .....</b>		<b>180</b>
<b>Liste des publications et communications .....</b>		<b>184</b>

# Liste des figures

---

Figure 1: Amplification du domaine D1/D2 et des régions ITS1/ITS2 chez la levure (D'après Yeast Molecular Taxonomy, Université de Davis) .....	8
Figure 2: Biosynthèse du diacylglycérol chez la levure (D'après Czabany et al., 2007; Daum et al., ..	26
Figure 3: Phospholipides membranaires chez la levure (D'après Ribéreau-Gayon et al., 2012) .....	27
Figure 4: Formation de phosphatidyl-éthanolamine selon la voie de Kennedy (D'après Carman and Henry, 1989).....	28
Figure 5: Principaux stérols de la levure et leur précurseur (squalène) (D'après Ribéreau-Gayon et al., 2012) .....	28
Figure 6: Mécanisme d'inhibition des microorganismes par le CO <sub>2</sub> (D'après (Garcia-Gonzalez et al., 2007)).....	32
Figure 7: Cycle "futile" de dissipation d'énergie en présence de CO <sub>2</sub> (D'après (Dixon and Kell, 1989) .....	34
Figure 8: Détection des levures et détermination de la viabilité par cytométrie en flux .....	38
Figure 9: Présentation du fermenteur double compartiment (D'après Renault et al., 2013) .....	39
Figure 10: Paramètres cinétiques mesurés au cours de la fermentation alcoolique.....	40
Figure 11: Différentes modalités testées lors des fermentations en fermenteur double compartiment .....	42
Figure 12: Comparaison des modalités avec inoculation de chaque espèce dans un seul ou deux compartiments du fermenteur (culture pures). Présentation des paramètres et composés présentant une différence significative (p<0,05) lors de la comparaison des 2 modalités Sc 1 comp et Sc 2 comp. ....	53
Figure 13: Effet densité et interactions. Présentation des paramètres et composés présentant une différence significative (p<0,05) lors des comparaisons des modalités « séparation » et « mélange » et des modalités Sc 1 comp et Sc 2 comp.....	54
Figure 14: Vitesse de dégagement de CO <sub>2</sub> au cours du temps (A) et vitesse maximale de dégagement du CO <sub>2</sub> (Vmax) (B) des cultures pures et mixtes .....	56
Figure 15: Cinétiques de croissance en de <i>T. delbrueckii</i> et <i>S. cerevisiae</i> en fermenteur double compartiment des cultures pures et mixtes .....	57
Figure 16 : Pourcentage de mortalité de <i>T. delbrueckii</i> .....	58
Figure 17 : Capacité biotique de <i>S. cerevisiae</i> .....	58
Figure 18: Teneurs en 4MSP et 3SH des cultures pures et mixtes.....	60

Figure 19: Concentration totale en esters impliqués dans la note fruitée des cultures pures et mixtes .....	61
Figure 20: Analyse en composante principale de la composition en esters impactant la note fruitée en fonction des cultures pures et mixtes .....	63
Figure 21: Production d'acidité volatile en cultures pures et mixtes.....	65
Figure 22: Cassette YFP inséré dans le gène <i>HO</i> .....	76
Figure 23: Caractéristiques des clones de <i>S. cerevisiae</i> obtenus après transformation avec la cassette KAN .....	77
Figure 24: Visualisation d'amplification des cassettes YFP et KAN sur gel d'agarose .....	79
Figure 25: Spectres d'émission de la protéine YFP et de l'IP.....	81
Figure 26: Séparation des cellules mortes, vivantes, YFP+ et YFP- par cytométrie en flux.....	82
Figure 27: Couples d'amorces utilisés pour déterminer le chromosome d'insertion de la cassette KAN .....	83
Figure 28: Bioréacteur 125 mL.....	85
Figure 29: Saturation des fermenteurs en CO <sub>2</sub> .....	86
Figure 30: Cinétiques de dégagement de CO <sub>2</sub> (A), de croissance et évolution de la proportion de cellules vivantes fluorescentes (B) des clones X5.46 et X5.48 .....	97
Figure 31: Vérification de l'insertion de la cassette KAN au sein de la copie du.....	98
Figure 32: Cinétiques de fermentation alcoolique des 8 clones X5YFP (A), de croissance et évolution de la proportion de cellules vivantes fluorescentes du clone X5YFP.4 (B).....	99
Figure 33 : Activité protéolytique (évolution de la DO440 nm) (A) et cinétiques de croissance (B) de différentes souches de levure durant la fermentation alcoolique.....	103
Figure 34: Composition en acides gras (A), rapport acides gras insaturés/acides gras saturés (B), composition en stérols (C) et rapport ergostérol/squalène (D) des produits commerciaux ...	105
Figure 35: Impact du CO <sub>2</sub> et du N <sub>2</sub> sur les différents paramètres de croissance et de fermentation. Présentation pour chaque espèce des paramètres et composés présentant une différence significative ( $p < 0,05$ ) lors de la comparaison des 2 modalités CO <sub>2</sub> et N <sub>2</sub> .....	107
Figure 36: Cinétiques de croissance de <i>P. kluyveri</i> en présence de CO <sub>2</sub> et de N <sub>2</sub> .....	108
Figure 37: Effet de la saturation en CO <sub>2</sub> et de la supplémentation du moût avec les produits commerciaux A, C et F sur les paramètres de croissance et de fermentation de différentes espèces de levure.....	111
Figure 38: Composition en acides gras (A) et en stérols (B) du moût avant fermentation, supplémenté ou non avec le produit F .....	115
Figure 39: Cinétiques de croissance des espèces non- <i>Saccharomyces</i> en fonction des différentes modalités .....	125



Figure 40: Cinétiques de fermentation (A) et de croissance (B) de <i>S. cerevisiae</i> en présence du mélange d'espèces de non- <i>Saccharomyces</i> en fonction de la souche de <i>S. cerevisiae</i> utilisée et du mode d'inoculation .....	127
Figure 41: Evolution de la population de <i>Metschnikowia</i> spp., <i>P. kluyveri</i> + <i>T. delbrueckii</i> , <i>C. zemplinina</i> et <i>H. uvarum</i> en fonction du mode d'inoculation et du type de souche de <i>S. cerevisiae</i> .....	128
Figure 42: Cinétiques de croissance des différentes espèces de non- <i>Saccharomyces</i> et <i>S. cerevisiae</i> dans le cas des arrêts de fermentation.....	133
Figure 43: Cinétiques de croissance de <i>S. cerevisiae</i> (PLC ET PLL) en présence du mélange d'espèces non- <i>Saccharomyces</i> et en fonction du facteur abiotique testé .....	135
Figure 44: Cinétiques de croissance des espèces de non- <i>Saccharomyces</i> d'intérêt en présence de <i>S. cerevisiae</i> et en fonction du facteur abiotique testé .....	137
Figure 45: Cinétiques de croissances des espèces de non- <i>Saccharomyces</i> indésirables en présence de <i>S. cerevisiae</i> et en fonction du facteur abiotique testé.....	138
Figure 46: Concentration en thiols volatils des différentes combinaisons ayant permis une fermentation alcoolique complète .....	140
Figure 47: Acidité volatile pour les différentes modalités testées.....	141

# Listes des tableaux

---

Tableau 1: Grands types d'interactions entre les microorganismes (Odum, 1953).....	9
Tableau 2: Espèces de levures non- <i>Saccharomyces</i> commercialisées en Europe .....	16
Tableau 3: Composition du Sauvignon Blanc 2012 .....	36
Tableau 4: Injection des thiols volatils en GC-MS .....	45
Tableau 5: Ions utilisés pour la détection et la quantification des thiols volatils .....	46
Tableau 6: Injection des esters en GC-MS.....	47
Tableau 7: Différences dans la composition en esters impliqués dans la note fruitée .....	62
Tableau 8: Souches utilisées .....	75
Tableau 9: Composition du Sauvignon Blanc 2013 .....	84
Tableau 10: Composition du milieu WL (en g/L) .....	88
Tableau 11: Couple d'amorces et températures d'hybridation utilisées pour l'amplification par PCR des différentes espèces.....	89
Tableau 12: Analyse des acides gras en GC-FID .....	92
Tableau 13: Analyse des stérols en GC-MS .....	92
Tableau 14: Mesure du pourcentage de cellules fluorescentes et de cellules viables pour les différents clones de <i>S. cerevisiae</i> X5 après transformation avec la cassette YFP .....	96
Tableau 15: Paramètres de croissance et de fermentation avec et sans azocaséine .....	102
Tableau 16: Analyse des protéines de la fraction P3 par HPLC en fin de fermentation alcoolique ..	104
Tableau 17: Quantité d'acides gras par mg de cellule et proportions (%) des différentes familles en fonction des conditions de fermentation .....	117
Tableau 18: Composition en stérols des différentes espèces (quantité totale de stérol et pourcentage de chaque stérol) et proportion en squalène .....	118
Tableau 19: Corrélations entre les paramètres de croissance et de fermentation et la composition lipidique .....	121
Tableau 20: Impact de la saturation en CO <sub>2</sub> , de la supplémentation avec le produit, de la souche de <i>S. cerevisiae</i> utilisée et du mode d'inoculation sur la durée de la phase de latence de fermentation alcoolique .....	130
Tableau 21: Impact de la saturation en CO <sub>2</sub> , de la supplémentation avec le produit, de la souche de <i>S. cerevisiae</i> utilisée et du mode d'inoculation sur la concentration en sucres résiduels et le titre alcoométrique volumique des vins. ....	131

# Liste des abréviations

---

## **Biologie moléculaire**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNr** : ADN ribosomique

**ARN** : Acide ribonucléique

**Chrs** : chromosome

**DGGE**: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

**EDTA** : Éthylène Diamine Tétracétate

**IP** : iodure de propidium

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**qPCR** : PCR quantitative

**TBE** : tampon Tris-Borate EDTA

**TE** : tampon Tris-EDTA

**Tm** : melting Temperature

**TTGE**: Temporal Temperature Gel Electrophoresis

## **Levures**

**Cz** : *Candida zemplinina*

**Hu** : *Hanseniaspora uvarum*

**Mets** : *Metschnikowia* spp.

**Pk** : *Pichia kluyveri*

**PLC** : phase de latence courte

**PLL** : phase de latence longue

**Sc** : *Saccharomyces cerevisiae*

**spp.** : species pluralis

**Td** : *Torulaspora delbrueckii*

**YFP** : yellow fluorescent protein

## **Unités**

**%** : pourcent

**°** : degré

**°C** : degré Celsius

**Da, kDa** : dalton, kilodalton

**g, mg, µg, ng** : gramme, milligramme, microgramme, nanogramme

**h, min, sec** : heure, minute, seconde

**M, mM, µM** : molaire, millimolaire, micromolaire

**L, mL, µL** : litre, millilitre, microlitre

**mol, mmol, µmol** : mole, millimole, micromole

**cm, nm** : centimètre, nanomètre

**pb** : paires de base

**p/v** : poids/volume

**rpm** : rotations par minutes

**S**: svedberg

**U**: unite

**UFC**: Unité Formant Colonie

**V** : volt

**v/v**: volume/volume

**X** : x fois concentré

## **Lipides**

**AP**: acide phosphatidique

**C8**: acide caprylique

**C10**: acide caprique

**C12**: acide laurique

**C14**: acide myristique

**C14:1**: acide myristoléique

**C16**: acide palmitique

**C16:1**: acide palmitoléique

**C18**: acide stéarique

**C18:1**: acide oléique

**C18:2**: acide linoléique

**CDP-DAG**: cytidine diphosphate-diacylglycérol

**CoA**: coenzyme A

**DAG**: diacylglycérol

**FID**: détecteur à ionisation de flamme

**GC:** gas chromatography

**HMG-CoA:** hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A

**MCFA:** acide gras à moyenne chaîne

**MS:** spectrométrie de masse

**MUFA:** acides gras mono-insaturés

**PC:** phosphatidylcholine

**PE:** phosphatidyléthanolamine

**PI:** phosphatidylinositol

**PS:** phosphatidylsérine

**PUFA:** acides gras poly-insaturés

**SFA:** acides gras saturés

**TAG:** triacylglycérol

## **Divers**

**3SH :** la 3-sulfanylhéxan-1-ol

**4MSP :** 4-méthyl-4-sulfanylpentane-2-one

**A3SH :** acétate de 3-sulfanylhéxan-1-ol

**CO<sub>2</sub> :** dioxyde de carbone

**CNRS :** centre national de la recherche scientifique

**CRBO :** centre de ressources biologiques œnologiques

**DO :** densité optique

**H<sub>2</sub>S :** sulfure d'hydrogène

**INRA :** Institut National de la Recherche Agronomique

**ISVV :** Institut des Sciences de la Vigne et du Vin

**N<sub>2</sub> :** diazote

**NAPDH :** Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**O<sub>2</sub> :** dioxygène

**pH :** potentiel Hydrogène

**SO<sub>2</sub> :** dioxyde de soufre

**UMR :** Unité Mixte de Recherche

**UV :** ultra-violet

**WL :** Wallerstein laboratory

**YPD :** yeast peptone dextrose

# Introduction

---

La fermentation « spontanée » avec les levures indigènes du raisin était la seule technique pratiquée au début du vingtième siècle. Mal maîtrisée, elle laissait le champ libre à de multiples complications. De très nombreux travaux ont été consacrés à l'identification et à l'évolution des espèces de levures au cours de cette fermentation. Tous montrent que *Saccharomyces cerevisiae* est l'agent principal de la fermentation alcoolique, même si d'autres levures, notamment les levures non-*Saccharomyces*, y participent. Les premiers levains industriels proposés pour l'élaboration du vin appartenaient donc logiquement à l'espèce *S.cerevisiae*. Ils étaient conditionnés en pâtes liquides, limitant leur conservation et donc leur développement sur le marché. Puis, dans les années 80, leur conditionnement a évolué sous forme de vermicelles déshydratés ou « levures sèches actives » (LSA), plus faciles d'utilisation. Le nombre de levures œnologiques disponibles sur le marché n'a alors cessé d'augmenter. En 2007, plus de 250 souches œnologiques, essentiellement de l'espèce *S.cerevisiae*, étaient proposées sur le marché français. Les levures industrielles sont sélectionnées sur leurs propriétés fermentaires mais également pour leurs incidences organoleptiques. Le levurage avec *S.cerevisiae*, sous forme de LSA permet de mieux maîtriser le déroulement de la fermentation alcoolique et d'éviter le développement d'une flore d'altération qui peut être à l'origine de déviations organoleptiques.

Cependant, depuis les années 1985-1990, l'émergence de la biologie moléculaire a rendu plus accessible l'identification des levures non-*Saccharomyces*. Depuis, de nombreuses études ont décrit leurs propriétés en œnologie : impact aromatique, potentiel enzymatique... Elles peuvent ainsi impacter négativement ou positivement les qualités organoleptiques des vins. Dans ce contexte, une sélection de nouvelles souches à utiliser en association avec *S.cerevisiae* (multi-starters) s'est développée il y a une dizaine d'années. Actuellement, cinq espèces (*Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, *Schizosaccharomyces pombe* et *Pichia kluyveri*) sont proposées sur le marché européen.

Si une grande majorité de praticiens utilise désormais les levures sélectionnées pour sécuriser la fermentation et orienter la composante aromatique, depuis quelques années, pour des raisons culturelles ou médiatiques, un nombre croissant de professionnels (agriculteurs biologiques ou pas) fait le choix de favoriser les populations autochtones de levures, de l'espèce *S.cerevisiae* ou d'autres genres de levure. Ils critiquent l'uniformisation organoleptique liée à une simplification de la flore levurienne par un apport exogène d'un clone de *S. cerevisiae*. Afin d'éviter les inconvénients liés à ce type de pratique, déjà décrits il y a 30 ans (accidents fermentaires et déviations

organoleptiques), il est nécessaire de rechercher les facteurs pouvant influencer le développement des levures afin de favoriser les espèces d'intérêt et de ralentir la croissance des levures indésirables, tout en maîtrisant la fermentation alcoolique.

La première partie de ce travail avait pour objectif de mieux comprendre les phénomènes d'interactions lors de l'utilisation de multi-starters (*S. cerevisiae* et les levures non-*Saccharomyces*) au cours de la fermentation alcoolique, en prenant comme modèle le couple *Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae*. Les interactions entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* lors de co-inoculation en fermenteur double compartiment ont déjà été étudiées au laboratoire (Renault et al., 2013). Ces travaux ont permis de mettre en évidence la mort précoce de *T. delbrueckii* lorsque les deux espèces sont cultivées en mélange, suggérant l'existence d'interactions impliquant le cell-cell contact. Afin d'approfondir les connaissances sur les interactions entre ces deux espèces, de nouveaux essais ont été réalisés et plusieurs modifications ont été apportées par rapport aux travaux précédents. Tout d'abord, même si il s'agit des mêmes espèces, le couple de souches utilisé est différent. Ici, les deux souches utilisées, commercialisées par la société Laffort qui a financé ce travail, étaient *T. delbrueckii* Zymaflore Alpha et *S. cerevisiae* Zymaflore X5. Le rapport d'inoculation de 20 :1 en faveur de *T. delbrueckii* appliqué lors de nos fermentations a été choisi pour permettre une croissance de cette dernière, ce qui n'avait pas été observé auparavant. Contrairement aux essais précédents, l'ensemble des fermentations est réalisé en moût et non en milieu synthétique ce qui nous a permis d'analyser la composition en esters et en thiols volatils du vin.

Les essais ont été effectués dans un réacteur à double compartiment développé au laboratoire (Renault et al., 2013). Une membrane centrale semi-perméable permet de séparer les deux compartiments du fermenteur. Les deux espèces peuvent alors être cultivées séparément ou en mélange tout en ayant un milieu de culture homogène entre les deux compartiments. La comparaison de ces deux types de cultures mixtes entre elles et par rapport aux cultures pures a permis de mieux comprendre les interactions entre ces deux espèces. De plus, afin de déterminer quels mécanismes moléculaires sont impliqués lors des interactions entre ces deux espèces, une analyse protéomique a été incluse dans cette étude.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié l'incidence de facteurs environnementaux sur le développement des levures (*S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces*). Plusieurs études ont mis en évidence que les populations de levures au cours de la fermentation alcoolique peuvent être influencées par de nombreux facteurs physico-chimiques (pH, température, addition de SO<sub>2</sub>, turbidité... ) et le type de vinification (macération à froid...) (Albertin et al., 2014a; Andorra et al., 2011; Mendoza et al., 2008; Pretorius, 2000; Zott et al., 2008). Dans ce travail deux facteurs

environnementaux ont été étudiés: l'impact de la supplémentation de produits commerciaux à base de dérivés de levures et la saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique.

La réglementation autorise la supplémentation du vin avec des produits commerciaux dérivés de levures (autolysats, écorces, levures inactivées) sauf en vinification biologique. Ces produits utilisés en vue d'améliorer la viabilité et le métabolisme des levures sont riches en nutriments et particulièrement en acides gras et en stérols. Cependant, leur impact précis sur le développement des levures et, en particulier, sur les levures non-*Saccharomyces* n'est pas connu.

Lors du démarrage de la fermentation alcoolique (spontanée ou inoculée) la concentration en CO<sub>2</sub> dissout dans le moût augmente progressivement jusqu'à atteindre une valeur de 1,2 g/L correspondant à la saturation, puis il y a dégagement du CO<sub>2</sub>. Nous avons souhaité étudier l'impact de cette saturation sur le démarrage de la croissance et de la fermentation alcoolique de différentes espèces de levures, jusqu'ici jamais étudié. L'objectif ici était de déterminer s'il y a des différences de sensibilité vis à vis du CO<sub>2</sub> en fonction des espèces et donc s'il était possible de favoriser les espèces non-*Saccharomyces* d'intérêt et de ralentir la croissance des levures indésirables, tout en sécurisant la fermentation alcoolique avec *S. cerevisiae*.

Pour cette étude, 5 espèces de levures non-*Saccharomyces* ont été retenues : *Hanseniaspora uvarum*, *Candida zemplinina* (espèces majoritaires dans les moûts), *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulaspora delbrueckii* et *Pichia kluyveri* (espèces minoritaires). A ce dispositif deux levures *S. cerevisiae* ont été ajoutées : l'une ayant une aptitude à démarrer rapidement la fermentation alcoolique (à phase de latence courte) et l'autre à phase de latence longue. La présence de *S. cerevisiae* est indispensable afin d'assurer le bon déroulement de la fermentation alcoolique.

L'impact du CO<sub>2</sub> et /ou de la supplémentation du moût a dans un premier temps été étudié en cultures pures, puis sur un mélange constitué des 5 espèces de non-*Saccharomyces* dans des proportions représentatives de celles retrouvées dans les moûts. L'effet de l'inoculation avec *S. cerevisiae* sur le mélange d'espèces a également été étudié, mettant en évidence l'existence d'interactions entre les espèces. L'objectif principal de l'étude était de rechercher les conditions (saturation en CO<sub>2</sub>, composition en lipides du moût, souche de *S. cerevisiae* utilisée...) permettant de stimuler les espèces de non-*Saccharomyces* présentant un intérêt en œnologie tout en limitant le développement des espèces indésirables et en sécurisant la fermentation alcoolique.



# Etude bibliographique

---

## 1 Les levures en oenologie

La fermentation alcoolique du moût de raisin est un processus complexe impliquant le développement de différentes espèces de levures. Si une grande variété d'espèces est observée, seule une dizaine de genres, en proportions variables, est retrouvée dans les grandes régions viticoles du monde.

### 1.1 Origine des levures du moût

D'après Barata et al. (2012), les levures associées au raisin et au moût peuvent être classées en 3 catégories : les espèces oligotrophes oxydatives (*Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp.), les espèces copiotrophes oxydatives (*Candida* spp.) ou à pouvoir fermentaire modéré (*Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp., *Metschnikowia* spp.) et les espèces fermentaires (*Candida zemplinina*, *Torulaspora* spp., *Zygosaccharomyces* spp., *Lachancea* spp., *Pichia* spp., *Saccharomyces* spp.). Les levures retrouvées dans les moûts peuvent provenir des baies de raisin mais on souligne de plus en plus le rôle de l'environnement du chai et du matériel vitivinicole (Henschke and Jiranek, 1993).

#### 1.1.1 Vigne et baie de raisin

Les levures retrouvées sur les baies de raisin sont majoritairement des non-*Saccharomyces* (Fleet et al., 2002). Différentes études ont mis en évidence que les genres *Rhodotorula*, *Cryptococcus* ainsi que l'espèce *A. pullulans* sont prédominants au niveau des feuilles et de l'écorce de la vigne (Davenport, 1974; Sabate et al., 2002). Les raisins verts ne contiennent que de faibles quantités de levures,  $10$  à  $10^3$  UFC/g. Les genres *Cryptococcus*, *Rhodotorula* et *Candida* sont principalement retrouvés (Fleet, 2003). La faible abondance de nutriments sur ces substrats favorise le développement des levures oligotrophes oxydatives. Au cours de la maturation, une fragilité de la peau des grains de raisins peut apparaître et entraîner la libération de jus sucré, même si les baies paraissent intactes, favorisant le développement d'espèces au pouvoir fermentaire modéré (Davenport, 1974; Fleet, 2003; Sabate et al., 2002). La maturation des baies conduit donc à une augmentation de la population totale et de la diversité. Ainsi, la quantité de levures retrouvée en surface des raisins sains à maturité atteint  $10^4$  à  $10^6$  UFC/g (Barata et al., 2012; Combina et al., 2005; Li et al., 2010). *Hanseniaspora uvarum* (ou sa forme anamorphe *Kloeckera apiculata*), est

définie par de nombreux auteurs comme l'espèce prédominante à la surface des baies et peut représenter jusqu'à 75% des levures totales isolées (Barata et al., 2012; Fleet et al., 2002). Les genres *Candida* et *Metschnikowia* sont également fréquemment retrouvés.

L'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, qui est l'agent principal responsable de la fermentation alcoolique, est très rarement isolée des baies saines, même à maturité. Sa fréquence d'isolement est inférieure à 1% chez les raisins sains mais peut atteindre 25% en présence de baies « abîmées » ou au stade de sur-maturation (Martini, 1993; Mortimer and Polsinelli, 1999).

### **1.1.2 Matériel et environnement du chai**

Une plus grande diversité est observée dans les moûts que sur les baies à maturité. En effet, si la majorité des espèces présentes sur baies est retrouvée dans les moûts, de nouvelles espèces sont souvent détectées. Ces dernières proviennent généralement de l'environnement du chai et du matériel. De plus, les concentrations élevées en sucres éliminent les espèces oligotrophes oxydatives (*Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp.) (Jolly et al., 2003a).

*S. cerevisiae* est fréquemment isolée de l'environnement du chai et du matériel vitivinicole. Différentes études ont mis en évidence qu'une même souche de *S. cerevisiae* peut être isolée d'un chai durant plusieurs années et réaliser la fermentation alcoolique du moût, sans avoir été détectée au niveau de la baie de raisin. Certaines levures non-*Saccharomyces* sont également retrouvées en faible proportion (Constantí et al., 1997; Vaughan-Martini and Martini, 1995).

## **1.2 Dynamique et diversité des populations de levures au cours de la fermentation alcoolique**

La population de levures totales retrouvée dans les moûts est généralement comprise entre  $10^4$  et  $10^6$  UFC/mL (jusqu'à  $10^7$  dans les vins liquoreux) et atteint un maximum d'environ  $10^8$  UFC/mL au cours de la fermentation alcoolique. En début de fermentation alcoolique, la proportion entre les levures non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae* varie en fonction de différents facteurs. Cependant, de la même façon que sur les baies à maturité, les non-*Saccharomyces* sont généralement majoritaires (Combina et al., 2005; Jolly et al., 2003a; Li et al., 2010; Martini et al., 1996; Povhe Jemec et al., 2001). Ainsi, les premières heures de la fermentation alcoolique sont propices pour isoler et détecter les levures non-*Saccharomyces* souvent retrouvées en forte proportion dans les moûts (Henschke and Jiranek, 1993). Les levures appartenant aux genres *Hanseniaspora* et *Candida* sont majoritairement isolées et peuvent représenter jusqu'à 90% de la population totale. Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Hanseniaspora uvarum*, *Candida zemplinina* (récemment

renommée *Starmerella bacillaris*) et *Candida stellata*. L'espèce *Metschnikowia pulcherrima* est traditionnellement présente dans les moûts à des niveaux de populations inférieurs aux genres précédents (2-10% de la population totale). Enfin, de nombreuses espèces de levures minoritaires peuvent être isolées des moûts parmi lesquelles : *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyverii*, *Pichia membranifasciens*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia terricolae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Debaromyces hansenii*...(Baleiras Couto et al., 2005; Combina et al., 2005; Li et al., 2010; Zott et al., 2008).

Puis du fait de nombreuses modifications du milieu au cours de la fermentation (augmentation de la concentration en éthanol, limitation du substrat, toxicité du milieu, dégagement de chaleur du fait du développement de *S. cerevisiae* (Goddard, 2008; Salvadó et al., 2011)), *S. cerevisiae* devient majoritaire et termine la fermentation alcoolique. Certaines levures non-*Saccharomyces* peuvent être retrouvées en faible quantité en fin de processus, particulièrement *H. uvarum* (Baleiras Couto et al., 2005; Povhe Jemec et al., 2001; Zott et al., 2010).

Les niveaux de populations des levures sur la baie au cours de la vinification sont influencés par plusieurs facteurs notamment les caractéristiques du vignoble, les conditions climatiques, les méthodes de vinification...

L'hypothèse que la typicité du vin soit liée au microbiote spécifique de la région de production a été évoquée à de nombreuses reprises. Néanmoins à ce jour, aucune étude n'a permis de mettre clairement en évidence l'existence d'espèces ou de souches représentant une signature du « terroir ». En effet, les populations subissent des fluctuations naturelles d'apparition et de disparition au cours du temps mais aucune souche commune à tous les sites d'une même région viticole n'a été retrouvée. Si le cépage n'a pas d'influence sur la composition des populations de levures, d'autres caractéristiques du vignoble ont un impact plus marqué notamment l'âge et la taille des vignes. Ainsi, une augmentation de la diversité est observée lorsque l'âge et la taille du vignoble augmentent (Barata et al., 2012).

Plusieurs études ont mis en évidence que les différences observées au niveau des populations présentes à la surface des baies semblaient être liées à des modifications climatiques survenant à l'approche des vendanges mais le sens d'évolution des populations reste difficile à prédire. Ainsi, (Combina et al., 2005) et (Čadež et al., 2010) ont montré qu'une augmentation des précipitations, était liée à une augmentation de la population totale. Ce phénomène peut s'expliquer par une augmentation de la disponibilité des nutriments en surface des baies. D'une part, l'augmentation du volume des baies du fait de la pluie au cours de la maturation favorise la libération de jus sucré, et, d'autre part, l'action de l'eau à la surface induit l'exosmose de petites molécules (Brown, 1915). En revanche, Comitini and Ciani (2006) ont mis en évidence que lors de précipitations importantes

la population de levures en surface des baies peut être jusqu'à 10 fois plus faible par rapport aux autres années.

Des précipitations importantes impliquent souvent une augmentation de l'utilisation de pesticides, particulièrement de fongicides. Cela entraîne généralement une diminution de la population levurienne totale en surface des baies et une diminution de la diversité, favorisant le développement des levures à pouvoir fermentaire modéré telles que *M. pulcherrima*, *C. stellata* et *H. uvarum*. L'impact des fongicides sur la diversité de *S. cerevisiae* dans les moûts et sur ces capacités fermentaires reste limité (Ganga and Martinez, 2004; Guerra et al., 1999; Jolly et al., 2003a).

### **1.3 Méthodes d'études des populations de levures**

#### **1.3.1 Techniques culturales et microscopiques**

Historiquement, les techniques culturales ont été très utilisées pour étudier les populations microbiennes (milieux gélosés, identification par observations microscopiques et biochimiques).

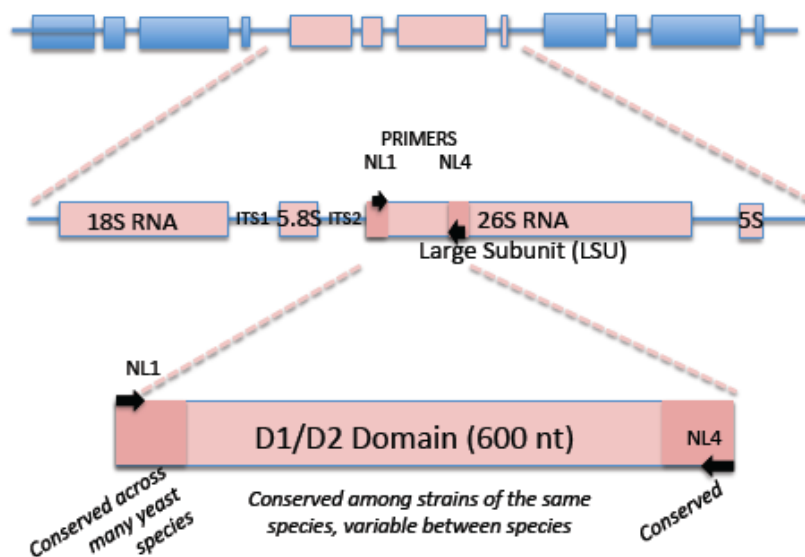
Cependant, bien qu'ayant fourni de nombreuses informations, ces méthodes de microbiologie « classique » ont montré leurs limites concernant l'analyse des populations microbiennes complexes. En effet, ces méthodes sont notamment longues et présentent un risque de contamination élevé. Le développement des méthodes moléculaires a contribué à développer les connaissances concernant les populations de levures du raisin et du moût, aussi bien qualitativement que quantitativement.

#### **1.3.2 Techniques de biologie moléculaire**

L'analyse de la diversité d'une population microbienne complexe implique l'utilisation de différents outils de biologie moléculaire tels que l'amplification d'ADN, le séquençage ou encore la digestion d'ADN par des enzymes de restriction.

Le séquençage de la région variable D1/D2 de l'ADN ribosomique 26S de la levure est une méthode largement utilisée (figure 1). La séquence cible (600 nucléotides) est amplifiée par PCR grâce au couple d'amorces NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) et NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (O'Donnell, 1993). Kurtzman and Robnett (1998) ont mis en évidence que la phylogénie des espèces obtenue après analyse des régions D1/D2 était concordante avec celle basée sur l'ADN ribosomique 18S, classiquement utilisé pour les analyses phylogénétiques. Les

souches présentant plus de 1% de différences sont considérées comme appartenant à des espèces différentes. Plus récemment, Baleiras Couto et al. (2005) ont montré que l'amplification de la région D1/D2 suivie d'une digestion par une plusieurs enzymes de restriction permettaient d'identifier différentes espèces de levures non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique du moût. Les résultats ont été confirmés par séquençage. L'utilisation des enzymes de restriction est plus facile, plus rapide et moins onéreuse que le séquençage et constitue donc un outil intéressant pour l'analyse de la diversité des populations.



**Figure 1: Amplification du domaine D1/D2 et des régions ITS1/ITS2 chez la levure (D'après Yeast Molecular Taxonomy, Université de Davis)**

L'analyse des régions inter-géniques ITS1 et ITS2 de l'ADN ribosmique 5,8S (figure 1) est une technique plus rapide et moins coûteuse que le séquençage des régions D1/D2. Cette méthode a été utilisée par Guillamón et al. (1998) pour l'identification des levures en œnologie. L'amplification de la séquence cible est réalisée grâce au couple d'amorces ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Les produits PCR sont ensuite digérés par des enzymes de restrictions (*HaeIII*, *HinfI*, *CfoI*, *DdeI*...). L'identification est effectuée en comparant les profils obtenus à ceux d'espèces de références. Si nécessaire, un séquençage ou des tests biochimiques complémentaires peuvent être réalisés.

Les électrophorèses en conditions dénaturantes sont également utilisées pour étudier les populations microbiennes complexes. L'électrophorèse avec gradient dénaturant a été mise au point pour la première fois au début des années 1980. En 1983, Fisher et Lerman décrivent un

protocole de DGGE permettant de séparer des fragments d'ADN possédant des différences de l'ordre de la paire de bases. Des fragments d'ADN de même longueur mais de séquences nucléotidiques différentes peuvent ainsi être séparés (Fisher and Lerman, 1983). Deux types d'électrophorèses en conditions dénaturantes existent : la DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) et la TTGE (temperature gradient gel electrophoresis). En DGGE, la dénaturation des fragments d'ADN se fait en présence d'agents chimiques contenus dans le gel, l'urée et le formamide, formant un gradient linéaire. En revanche, en TTGE, la variation de la température du tampon de migration au cours du temps va permettre la dénaturation. Dans le cas des populations microbiennes complexes, une amplification de l'ADN par PCR est préalablement effectuée afin d'obtenir des quantités de matrice suffisantes pour l'analyse. L'utilisation de la DGGE a été appliquée à l'écologie microbienne pour la première fois par Muyzer et al. (1993). DGGE et TTGE sont utilisées depuis quelques années pour caractériser la population de levures en œnologie (Andorrà et al., 2008; Cocolin et al., 2000; Di Maro et al., 2007; Urso et al., 2008).

La PCR quantitative (qPCR) est aussi appliquée à différents aspects en œnologie, aussi bien pour la quantification d'espèces de levures que pour l'étude de la population des bactéries lactiques (Nannelli et al., 2008; Neeley et al., 2005; Zott et al., 2010). L'une des principales applications de la qPCR en œnologie est la détection de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* (Delaherche et al., 2004; Phister and Mills, 2003; Tessonnier et al., 2009).

## 2 Interactions au cours de la fermentation alcoolique

### 2.1 Les grands types d'interactions

La présence de différents microorganismes au sein d'un même milieu induit l'existence d'interactions. Différents types d'interactions (tableau 1) ont été décrits entre les microorganismes : le neutralisme, le commensalisme, le mutualisme, l'amensalisme, le parasitisme et la compétition (Odum, 1953).

**Tableau 1: Grands types d'interactions entre les microorganismes (Odum, 1953)**

Type d'interaction	Définition
Neutralisme	Aucune population n'est affectée par la présence de l'autre
Commensalisme	Une population est favorisée, l'autre n'est pas affectée
Mutualisme	Les deux populations tirent bénéfice de la présence de l'autre
Amensalisme	Une population est inhibée par la présence de l'autre, la seconde n'est pas affectée
Parasitisme	Une population se développe au dépend de l'autre
Compétition	Les deux populations sont affectées

## **2.2 Interactions entre les levures au cours de la fermentation alcoolique**

### **2.2.1 Mécanismes mis en jeux au cours de la vinification**

Différents mécanismes d'interaction sont décrits dans la littérature et sont susceptibles d'être impliqués en œnologie : compétition pour les nutriments (sources azotées, vitamines...) et la disponibilité en oxygène, production de composés toxiques (éthanol, toxines, killer, acides gras à courtes chaînes...), cell-cell contact et quorum sensing (Fleet, 2003; Holm Hansen et al., 2001; Nissen and Arneborg, 2003, 2003; Renault et al., 2013; Strehaiano et al., 2008).

Le cell-cell contact met en jeu des interactions liées à la proximité physique des cellules. Si ce mécanisme est fréquemment évoqué en œnologie, les molécules impliquées et leurs effets ne sont pas encore élucidés (Ciani and Comitini, 2015; Fleet, 2003; Nissen and Arneborg, 2003). Le quorum-sensing est un procédé de communication cellulaire impliquant des molécules signal de faible poids moléculaire. Ces molécules sont produites pendant la croissance et lorsque leur concentration atteint une valeur seuil, cela induit l'activation ou l'inhibition de certains gènes. Chez les bactéries Gram-, le mécanisme quorum-sensing est notamment mis en jeu lors de la formation de biofilms. En œnologie chez les levures, le quorum-sensing a déjà été évoqué (Bisson, 1999). Différentes molécules pourraient jouer le rôle de molécules signal, telles que le bicarbonate (Ohkuni et al., 1998), l'acétaldéhyde (Cheraiti et al., 2005; Richard et al., 1996), l'ammonium (Palková et al., 1997)... Néanmoins, peu d'études sont réalisées en conditions œnologiques.

### **2.2.2 Interactions *S. cerevisiae*/*S. cerevisiae***

Différentes études ont mis en évidence l'existence d'interactions entre différentes souches de *S. cerevisiae*. Ainsi, (Howell et al., 2006), ont montré que lors de fermentations avec un mélange de souches de *S. cerevisiae*, le profil aromatique est différent de celui obtenu si les cultures pures sont mélangées après la fermentation alcoolique, suggérant l'existence d'interactions entre les souches en présence.

En 2013, l'hypothèse d'un phénomène d'interaction par cell-cell contact a été évoquée pour expliquer le phénomène de dominance de certaines souches de *S. cerevisiae*. Différentes souches de *S. cerevisiae* ont été isolées de moût Nebbiolo en fermentation. L'analyse du gène *SED1* codant pour des protéines membranaires a révélé un dimorphisme au sein des souches sélectionnées. Deux types de fermentations mixtes ont ensuite été effectuées avec des couples de souches présentant des profils *SED1* différents : en mélange ou séparées par une membrane mais partageant le même milieu de culture. L'analyse des profils *SED1* après fermentation a révélé qu'en mélange, certaines souches « non-compétitives » n'étaient plus détectées, un seul profil

correspondant à la souche dominante était retrouvé. Ce résultat a été confirmé par les dénombrements en milieux gélosés suivis d'une amplification d'ADN par PCR sur colonie du gène *SED1*, montrant une chute importante de la population « non-compétitive ». En revanche, ce phénomène n'est pas observé lorsque les souches sont cultivées séparément en bioréacteur deux compartiments avec une membrane permettant le passage du milieu de culture. Dans ce cas, les deux populations de *S. cerevisiae* atteignent de concentrations similaires (Perrone et al., 2013). Ces résultats peuvent être expliqués par le mécanisme proposé par Nissen and Arneborg (2003), suggérant que l'inhibition de la croissance est due au cell-cell contact ou à la proximité entre les cellules.

### **2.2.3 Interactions *S. cerevisiae*/non-*Saccharomyces***

Les levures non-*Saccharomyces* peuvent impacter négativement ou positivement la qualité du vin *via* la production de composés indésirables (acide acétique, acétaldéhyde, acétoïne, acétate d'éthyle...) ou désirables (thiols volatils, certains esters, alcools supérieurs...). Certaines levures non-*Saccharomyces* présentent donc un intérêt en œnologie du fait de leur capacité à augmenter la complexité aromatique des vins par rapport à une fermentation réalisée uniquement avec *S. cerevisiae*. En effet, si les fermentations spontanées restent difficiles à contrôler, l'utilisation de starters industriels de *S. cerevisiae* est de plus en plus critiquée du fait de la crainte d'une certaine standardisation des vins. L'inoculation avec une souche industrielle de *S. cerevisiae* entraîne l'inhibition de la majorité des espèces de non-*Saccharomyces*, désirables et indésirables (Ciani et al., 2010).

Depuis une dizaine d'année, plusieurs levains mixtes, associant *S. cerevisiae* à des non-*Saccharomyces*, sont apparus sur le marché. Néanmoins, du fait de la complexité et de la méconnaissance des phénomènes d'interactions, la qualité finale du vin reste difficile à prédire.

#### **2.2.3.1 Cell-cell contact**

L'hypothèse d'une inhibition de la croissance des non-*Saccharomyces* par cell-cell contact en présence de *S. cerevisiae* a été évoquée pour la première fois par (Nissen and Arneborg, 2003). Les essais réalisés ont montré qu'en culture mixte avec *S. cerevisiae*, un arrêt de fermentation précoce et une croissance maximale plus faible sont observés pour *T. delbrueckii* et *L. thermotolerans* par rapport aux cultures pures, et ce malgré un taux de croissance similaire. En fonction du couple de souches utilisé, une mort précoce des non-*Saccharomyces* peut être observée. Les hypothèses d'une inhibition liée à la limitation nutritionnelle (ou en oxygène), à la présence de composés



inhibiteurs ainsi qu'un phénomène de quorum-sensing ont été écartées. En effet, l'inhibition de la croissance et de la fermentation de *T. delbrueckii* et *L. thermotolerans* est observée même lorsque que les cultures sont effectuées sans limitation en oxygène avec apport de milieu neuf. De plus, lorsque ces deux espèces sont cultivées en présence de surnageant de culture de *S. cerevisiae*, ce phénomène n'est plus observé, excluant l'implication de composés toxiques ou de molécules signal liées au quorum-sensing. En revanche, l'inhibition des non-*Saccharomyces* a lieu systématiquement lorsque des cellules viables de *S. cerevisiae* sont rajoutées dans le milieu de culture. Lorsque les deux espèces sont cultivées séparément grâce à un boudin de dialyse, la cinétique de croissance de *T. delbrueckii* et *L. thermotolerans* est similaire aux cultures pures, suggérant ainsi une inhibition par cell-cell contact ou liée à la compétition pour l'espace avec *S. cerevisiae* (Nissen and Arneborg, 2003; Nissen et al., 2003).

L'étude des mécanismes d'interactions a pu être approfondie ces dernières années grâce au développement de nouveaux outils permettant de cultiver deux espèces différentes, en mélange ou séparément. Une membrane semi-perméable permet de séparer deux compartiments en empêchant le passage des microorganismes, tout en laissant diffuser le milieu de culture (Albasi et al., 2002; Manjarrez et al., 2000; Renault et al., 2013). Avec ce type d'outils, l'existence d'interactions impliquant le cell-cell contact ou une compétition pour l'espace a été évoquée lors d'une autre étude avec *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii* réalisée au laboratoire (Renault et al., 2013). Les résultats ont mis en évidence que la proximité voire le contact physique entre les deux espèces induit la mort précoce de *T. delbrueckii*.

### 2.2.3.2 Implication de composés toxiques

#### 2.2.3.2.1 Ethanol et acides gras à courtes et moyennes chaînes

La production d'éthanol par *S. cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique constitue une importante pression de sélection, et permet en partie d'expliquer la prédominance de cette espèce sur d'autres (Henschke, 1997). L'éthanol modifie les systèmes de transports actifs de la cellule ralentissant ainsi l'assimilation de composés azotés ce qui paralyse la levure (Henschke and Jiranek, 1993). La sensibilité à l'éthanol varie en fonction des espèces. Ainsi parmi les non-*Saccharomyces*, *T. delbrueckii* fait partie des espèces les plus résistantes contrairement à *H. uvarum*. La résistance à l'éthanol peut être augmentée grâce à différents facteurs tels que la diminution de la température (Gao and Fleet, 1988) ou la présence d'acides gras insaturés et de stérols dans le milieu (Pina et al., 2004).

Les acides gras à courtes et moyennes chaînes résultent du métabolisme des levures au cours de la fermentation et comportent 6 à 14 atomes de carbone. S'ils sont présents en trop grande quantité dans le milieu, ils peuvent être toxiques pour la levure entraînant ainsi une mortalité cellulaire importante. Les acides décanoïque (C10) et dodécanoïque (C12) sont les plus toxiques (Lafon-Lafourcade et al., 1984; Larue and Lafon-Lafourcade, 1989). Ces acides gras modifient la perméabilité membranaire et perturbent le passage des nutriments (Geneix, 1984; Salmon et al., 1993).

#### 2.2.3.2.2 Toxines « killer » et autres composés antimicrobiens

Certaines souches de levures « killer » sont capables de produire des toxines extracellulaires, létales pour d'autres levures. Ces dernières sont alors qualifiées de « sensibles » contrairement aux levures « neutres » qui ne produisent pas de toxine mais présentent une résistance (Heard and Fleet, 1987). Les toxines killer sont de nature protéique et sont retrouvées aussi bien chez *S. cerevisiae* que chez les non-*Saccharomyces*. Si les toxines sécrétées par *S. cerevisiae* ne sont généralement actives que contre un genre de levure, les toxines des non-*Saccharomyces* présentent le plus souvent un spectre d'action plus large (Ceccato-Antonini et al., 1999; Shimizu, 1993; Young, 1987).

La sécrétion de toxines « killer » pourrait donc jouer un rôle dans l'évolution des différentes populations de levures au cours de la fermentation alcoolique (Fleet, 2003). Néanmoins, l'expression de ce caractère est impacté par de nombreux facteurs physico-chimiques (pH, présence de composés phénoliques dans le vin qui ont un effet inhibiteur) ainsi que par le processus de vinification. Il est donc difficile de déterminer quel est son véritable rôle dans la modulation des interactions entre espèces de levures.

L'existence de peptides antimicrobiens sécrétés par *S. cerevisiae* a été mise en évidence dans plusieurs études (Albergaria et al., 2010; Branco et al., 2014). Ces peptides correspondent à des fragments de la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase. Le spectre d'action de ces peptides a été testé sur milieu gélosé et une action fongicide a été observée pour *H. guilliermondii*, *L. thermotolerans*, *B. bruxellensis* et *K. marxianus*. Seul un effet fongistatique a été observé pour *T. delbrueckii*. Il entraîne une diminution du pH intracellulaire de *H. guilliermondii* après 20 minutes d'exposition entraînant ainsi une modification du gradient de pH et la perméabilité membranaire. A terme, une perte totale de cultivabilité est observée pour cette espèce avec environ 20% de cellules sous forme viable non cultivable (Branco et al., 2014). Une activité antimicrobienne a également été

observée contre la bactérie *Oenococcus oeni* responsable de la fermentation malolactique (Branco et al., 2015). Il a également été montré que dans le cas de cultures mixtes *S. cerevisiae*/*L. thermotolerans*, le phénomène de mort précoce de cette dernière serait lié à la fois à la production de peptides antimicrobiens par *S. cerevisiae* et à du cell-cell contact (Kemsawasd et al., 2015). Néanmoins, l'ensemble des essais réalisés jusqu'à présent a été effectué en milieu de laboratoire, l'implication exacte de ces peptides lors des interactions entre *S. cerevisiae* et les non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique n'est pas encore déterminée.

Les interactions entre *H. guilliermondii* et *S. cerevisiae* avaient déjà été étudiées auparavant. Une mort précoce de *H. guilliermondii* est observée en culture mixte. En comparant les résultats obtenus avec les cultures pures de non-*Saccharomyces*, l'hypothèse d'une inhibition liée à la concentration en éthanol a été écartée. Le phénomène de mort précoce de *H. guilliermondii* est observé quand la population de *S. cerevisiae* atteint un certain seuil. De plus, des fermentations réalisées en présence de surnageants de *S. cerevisiae* a permis de mettre en évidence que ce phénomène ne serait pas lié uniquement à du cell-cell contact mais impliquerait également des molécules toxiques (Perez-Nevado et al., 2006). Des résultats similaires ont été obtenus pour l'espèce *H. uvarum* (Perez-Nevado et al., 2006; Wang et al., 2015).

*M. pulcherrima* est également connue pour inhiber la croissance de différentes espèces de levures. Cette activité antimicrobienne a été testée sur plus d'une centaine de souches appartenant aux genres *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Brettanomyces*, *Debaromyces* et *Saccharomyces*. Un screening sur milieu gélosé a permis de mettre en évidence une activité antimicrobienne contre les souches appartenant aux genres *Brettanomyces*, *Hanseniaspora* et *Pichia* (Mehlomakulu et al., 2015; Nguyen and Panon, 1998; Oro et al., 2014). Des fermentations ont ensuite été réalisées avec différents couples : *M. pulcherrima*/*H. guilliermondii*, *M. pulcherrima*/*B. bruxellensis* et *M. pulcherrima*/*P. membranifasciens*. Dans chaque cas, une mort précoce est observée pour les trois espèces. Les mêmes essais effectués dans du milieu supplémenté en fer ont montré une disparition de l'inhibition se traduisant par deux comportements différents : une mort précoce de *M. pulcherrima* en présence de *P. membranifasciens* ou une compétition avec *H. guilliermondii* et *B. bruxellensis*. L'effet inhibiteur serait donc lié à la quantité de fer dans le milieu ce qui expliquerait l'absence d'effet sur *S. cerevisiae* dont l'expression des gènes régulateurs impliqués dans le métabolisme du fer est régulée par un facteur de transcription AFT1 (Hamza and Baetz, 2012; Holmes-Hampton et al., 2013).

### 2.2.3.3 Limitation nutritionnelle, compétition pour substrat

Au cours de la fermentation alcoolique survient le développement de différentes espèces de levures entraînant une compétition pour la consommation d'oxygène, vitamines, et composés azotés pouvant devenir limitant. La limitation nutritionnelle peut aussi bien affecter *S. cerevisiae* que les non-*Saccharomyces*.

En effet, la croissance des levures non-*Saccharomyces* entraîne une diminution de la disponibilité en nutriments pour *S. cerevisiae*, notamment en azote assimilable (Bataillon et al., 1996; Fleet and Heard, 1993). De plus, les souches commerciales de *S. cerevisiae* semblent avoir un besoin en azote assimilable supérieur aux souches indigènes (Barrajón-Simancas et al., 2011; Carrau et al., 2008). Des fermentations réalisées avec *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* ont montré que cette dernière avait une consommation en azote assimilable plus importante (Taillandier et al., 2014). À l'inverse, *L. thermotolerans* (*K. thermotolerans*) entre en compétition avec *S. cerevisiae* du fait de ses besoins en azote élevés (Ciani et al., 2006). En fonction des souches utilisées, des fermentations languissantes ou incomplètes peuvent avoir lieu. Ce phénomène est d'autant plus important qu'une inoculation séquentielle de *S. cerevisiae* est effectuée, permettant ainsi aux non-*Saccharomyces* de se développer (Medina et al., 2012). De plus, des études sur l'incorporation de la thiamine au cours des premières heures de la fermentation ont montré que *H. uvarum* était capable de consommer cette vitamine plus rapidement que *S. cerevisiae*, pouvant ainsi affecter la croissance de cette dernière (Bataillon et al., 1996; Bisson, 1999).

La croissance rapide de *S. cerevisiae* entraîne une diminution importante de la quantité d'oxygène dissout du milieu et une saturation du milieu en CO<sub>2</sub> pouvant avoir un effet inhibiteur (Blickstad et al., 1981; Gill and Tan, 1979; King and Nagel, 1975). Cela pourrait contribuer à la mort précoce des non-*Saccharomyces* dont certaines, telles que *H. uvarum* et *T. delbrueckii*, sont très sensibles au manque d'oxygène (Holm Hansen et al., 2001). En effet, l'oxygène est indispensable à certaines voies de biosynthèse telle que la synthèse des stérols et acides gras insaturés de la membrane potentiellement impliqués dans la résistance à l'éthanol (Pina et al., 2004).

### 3 Propriétés des levures non-*Saccharomyces* fréquemment isolées des moûts en fermentation

Depuis quelques années, différentes espèces de levures non-*Saccharomyces* sont commercialisées par les industriels et destinées à être utilisées en association avec *S. cerevisiae* (tableau 2). Les propriétés des cinq espèces de non-*Saccharomyces* étudiées dans ce travail (*T. delbrueckii*, *C. zemplinina*, *H. uvarum*, *P. kluyveri* et *M. pulcherrima*) sont présentées dans cette partie.

**Tableau 2: Espèces de levures non-*Saccharomyces* commercialisées en Europe**

Industriel	Produit	Espèce	Recommandations des fabricants
Laffort	Zymaflore Alpha	<i>T. delbrueckii</i>	Intensité aromatique, volume et longueur en bouche, réduction de l'acidité volatile
Lallemand	Level 2 TD	<i>T. delbrueckii</i> <i>S. cerevisiae</i>	Complexité aromatique des vins blancs peu aromatiques
	Biodiva TD291	<i>T. delbrueckii</i>	Complexité aromatique, réduction de l'acidité volatile
	Flavia Mp346	<i>M. pulcherrima</i>	Surexpression aromatique de vins blancs et rosés : terpènes, thiols volatils
	ProMalic (encapsulée)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Désacidification (transformation de l'acide malique en alcool)
Chr Hansen	Prelude	<i>T. delbrueckii</i>	Intensité aromatique, rondeur en bouche, réduction de l'acidité volatile
	Concerto	<i>L. thermotolerans</i>	Acidification naturelle (acide lactique), note fruitée, arômes fruits noirs, Fraîcheur
	Melody	<i>T. delbrueckii</i> <i>L. thermotolerans</i> <i>S. cerevisiae</i>	Complexité aromatique, rondeur en bouche, équilibre
	Frootzen (congelée)	<i>P. kluyveri</i>	Productions thiols volatils, augmentation esters d'acides gras, réduction de l'acidité volatile

#### 3.1 *Torulaspora delbrueckii*

*T. delbrueckii* est une levure ubiquitaire pouvant être isolée du sol, des plantes, des fruits et des insectes (Capriotti, 1957; Limtong and Koowadjanakul, 2012; Nguyen et al., 2007; Tokuoka et al., 1985). Elle est associée à de nombreux bioprocédés tels que la panification, l'ensilage, la fabrication de cacao, de produits laitiers fermentés et de boissons fermentées (cidre, kéfir)... (Coton et al., 2006; Lhomme et al.; Loretan, 2003; Pacheco et al., 2012; Papalexandratou et al., 2011; Welthagen, 1998). Elle est connue pour être associée au processus de vinification depuis de nombreuses années (Castelli, 1954), néanmoins, comme les autres levures non-*Saccharomyces*, elle a longtemps été laissée de côté du fait de l'intérêt longtemps porté à *S. cerevisiae* et au développement de nombreux levains industriels utilisant cette dernière.

Récemment, des marqueurs microsatellites ont été développés au laboratoire et ont permis de mieux étudier la diversité de l'espèce *T. delbrueckii*. L'analyse microsatellite a permis de mettre en évidence 4 clusters génétiques : deux groupes contenant des souches principalement isolées de l'environnement provenant de l'ancien continent et du continent américain et deux associés à la vinification et autres bioprocess (Albertin et al., 2014b). Une grande hétérogénéité entre les souches est observée au niveau de la capacité fermentaire. La production d'éthanol varie le plus souvent entre 7 et 10% (v/v) mais certaines souches peuvent aller jusqu'à 12% (Cabrera et al., 1988; Herraiz et al., 1990).

*T. delbrueckii* a un impact positif sur la qualité organoleptique des vins. En effet, lors de la fermentation alcoolique, elle produit peu de composés indésirables tels que l'acétoïne, l'acide acétique, l'acétate d'éthyle et les phénols volatils (Cabrera et al., 1988; Ciani and Maccarelli, 1997; Ciani and Picciotti, 1995; Ciani et al., 2006; Herraiz et al., 1990; Martinez et al., 1990; Peynaud, 1956; Plata et al., 2003; Shinohara et al., 2000). Elle est particulièrement intéressante en conditions hyperosmotiques du fait de sa faible production d'acidité volatile (Bely et al., 2008; Ciani et al., 2006).

De plus, plusieurs auteurs ont montré que la forte activité  $\beta$ -glucosidase de *T. delbrueckii* lui permet de libérer de nombreux composés aromatiques tels que les nor-isoprénoides, les terpénols, et les lactones (Azzolini et al., 2012; Charoenchai et al., 1997; Comitini et al., 2011; Hernandez-Orte et al., 2008). Certaines souches sont également capables de produire des alcools supérieurs en plus grande quantité que *S. cerevisiae* (Herraiz et al., 1990; Moreno et al., 1991).

Les thiols volatils sont des composés aromatiques contribuant aux notes fruitées de nombreux vins blancs et particulièrement au Sauvignon blanc. Les trois molécules retrouvées majoritairement dans le Sauvignon Blanc sont la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP), la 3-sulfanylhéxan-1-ol (3SH) et l'acétate de 3-sulfanylhéxanyl (A3SH). La 4MSP est responsable des arômes de buis et de cassis (Darriet et al., 1991, 1993) et est généralement retrouvée à des concentrations inférieures à 70 ng/L (Tominaga et al., 2000). Le 3SH, plus abondant, confère aux vins blancs et rosés les notes fruitées de fruit de la passion et pamplemousse (Ferreira et al., 2002; Murat et al., 2001; Tominaga et al., 2000). Du fait de leur faible seuil de perception (quelques ng/L), ils contribuent significativement au profil aromatique des vins. La 4MSP et le 3SH sont produits à partir des précurseurs cystéinylés et glutathionylés présents dans le moût grâce à l'action des  $\beta$ -lyases des levures (Coetzee and du Toit, 2012; Darriet et al., 1995; Fedrizzi et al., 2009; Peyrot des Gachons et al., 2002; Roland et al., 2011; Subileau et al., 2008). Si elle ne produit pas de 4-méthyl-4-

sulfanylpentan-2-one (4MSP), d'importantes quantités de 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) sont retrouvés dans les vins fermentés avec *T. delbrueckii* (Sadoudi et al., 2012; Zott et al., 2011).

Différentes études ont montré que, en culture pure, *T. delbrueckii* produit de plus faibles quantités d'esters que *S. cerevisiae* (Hernandez-Orte et al., 2008; Plata et al., 2003; Renault et al., 2009; Viana et al., 2008). En 2015, Renault et al. ont montré que lors de co-inoculations avec *S. cerevisiae* X5, trois esters contribuant à la note fruitée des vins sont produits spécifiquement par *T. delbrueckii* Alpha (propanoate d'éthyle, isobutanoate d'éthyle et dihydrocinnamate d'éthyle) et leur concentration est corrélée avec la population maximale de cette dernière. En revanche, elle produit de faibles quantités d'octanoate d'éthyle, de décanoate d'éthyle et d'hexanoate d'éthyle (Renault et al., 2009). Toujours dans le cas de co-inoculation avec *S. cerevisiae* en conditions hyperosmotiques, une diminution de l'acidité volatile et de l'acétaldéhyde est observée jusqu'à 53% et 65% respectivement (Bely et al., 2008). Une diminution de la concentration en ces deux composés a également été observée lors de co-inoculation avec *L. thermotolerans* (Cherai et al., 2005; Ciani et al., 2006).

### 3.2 *Candida zemplinina*

*C. zemplinina* (nouvellement renommée *Starmerella bacillaris*) a longtemps été confondue avec *Candida stellata*. L'espèce *C. zemplinina* a été décrite et caractérisée en 2003 comme osmotolérante, psychrotolérante avec une meilleure croissance en présence d'éthanol que *C. stellata* (Sipiczki, 2003, 2004). Depuis sa reclassification, certaines souches identifiées comme *C. stellata* lors d'études précédentes ont pu être identifiées comme *C. zemplinina*, mettant en évidence l'occurrence fréquente de cette espèce lors de la fermentation alcoolique du vin. En 2008, Csoma et Sipiczki ont ainsi montré que sur 41 souches isolées de baies, moûts ou vins, initialement identifiées comme *C. stellata*, 30 appartenaient en réalité à l'espèce *C. zemplinina*.

Le caractère fructophile de *C. zemplinina* a été reporté plusieurs fois dans la littérature (Magyar and Tóth, 2011; Mills et al., 2002; Soden et al., 2000) et présente un intérêt pour prévenir les arrêts de fermentation. En effet, au cours de la fermentation la proportion fructose/glucose augmente et *S. cerevisiae* présente un caractère glucophile. *C. zemplinina* produit généralement entre 5 et 6% d'alcool et possède un rendement en éthanol jusqu'à 60% plus faible que *S. cerevisiae* en fonction des souches (Magyar and Tóth, 2011; Bely, 2013). Certains auteurs ont suggéré que ce faible rendement en éthanol était dû à la surproduction de glycérol et d'acidité volatile (Soden et al., 2000). Néanmoins, d'autres essais ont pu montrer que malgré une faible production de glycérol et d'acidité volatile, le rendement en éthanol observé pour *C. zemplinina* était toujours inférieur à *S. cerevisiae* (Magyar and Tóth, 2011; Mills et al., 2002). *C. zemplinina* peut aussi avoir un effet négatif

sur le profil analytique des vins du fait de la diminution de la concentration en lactones et en terpènes et de la production de composés soufrés tels que le sulfure d'hydrogène, l'acétoïne, l'acétate d'éthyle (Englezos et al., 2015; Sadoudi et al., 2012; Tofalo et al., 2012).

L'utilisation de *C. zemplinina* en culture mixte avec *S. cerevisiae* peut permettre de diminuer la production d'acide acétique par cette dernière. En effet, les fortes concentrations en sucres des moûts entraînent une régulation positive de la production d'acide acétique. Du fait de son caractère fructophile, *C. zemplinina* va consommer le fructose réduisant ainsi la pression osmotique du milieu (Rantsiou et al., 2012; Sadoudi et al., 2012). Concernant la réduction d'alcool, à ce jour, en culture mixte les concentrations en éthanol obtenues restent similaires à celles de *S. cerevisiae* (Sadoudi et al., 2012; Zara et al., 2014).

### **3.3 *Hanseniaspora uvarum***

Cette espèce fait partie des levures apiculées majoritaires isolées de la surface des baies et des moûts en début de fermentation. Elle est caractérisée par un pouvoir fermentaire faible avec une production d'éthanol n'excédant généralement pas 4 à 7% (v/v). Néanmoins, certaines souches sont capables de dominer la fermentation jusqu'à 6% d'alcool et de maintenir une croissance jusqu'à 12,5% (Moreira et al., 2011). De plus, il a été observé qu'en début de fermentation, certaines souches peuvent avoir une croissance plus rapide que *S. cerevisiae* (Moreira et al., 2008).

L'effet de la contribution de *H. uvarum* sur les fermentations alcooliques est controversé. Certains auteurs ont notamment montré que cette espèce produit jusqu'à cinq fois moins d'alcools supérieurs que *S. cerevisiae* (Herraiz et al., 1990; Moreira et al., 2008; Romano, 2003). L'inoculation de *H. uvarum* en co-culture avec *S. cerevisiae* peut ainsi contribuer à la diminution de la concentration en alcools supérieurs du vin (Moreira et al., 2008) mais ce phénomène n'est pas toujours observé (Gil et al., 1996). Les alcools supérieurs, lorsqu'ils sont présents en faible quantité, peuvent contribuer positivement à la qualité du vin. En revanche, à des concentrations supérieures à 400 mg/L ils ont un effet indésirable (Rapp and Mandery, 1986). Les levures apiculées et notamment *H. uvarum* sont aussi caractérisées par la production d'importantes quantités d'acétate d'éthyle et d'acide acétique par rapport à la quantité d'éthanol produit (Ciani and Maccarelli, 1997; Ciani and Picciotti, 1995) ce qui est préjudiciable pour la qualité du vin. Si en culture mixte avec *S. cerevisiae* sa production d'acidité volatile reste modérée, la quantité d'acétate d'éthyle, responsable de la piqûre acétique, peut augmenter jusqu'à dépasser le seuil de perception (Ciani et al., 2006).



### 3.4 *Pichia kluyveri*

La caractéristique de *P. kluyveri* la plus fréquemment évoquée dans la littérature est la production d'une toxine killer (Middelbeek et al., 1979, 1980a, 1980b; Pintar and Starmer, 2003; Radler et al., 1985; Starmer et al., 1992; Zorg et al., 1988). Cette toxine est active lorsque le pH est compris entre 2,5 et 4,7 et agit en augmentant la perméabilité membranaire aux protons, entraînant ainsi une diminution du pH intracellulaire puis la mort cellulaire. (Middelbeek et al., 1979, 1980a). La sensibilité de *S. cerevisiae* à la toxine killer produite par *P. kluyveri* a été mise en évidence en milieu de laboratoire, néanmoins, son impact en conditions œnologiques n'a pas encore été démontré (Middelbeek et al., 1980b).

Anfang et al. (2009) ont également montré que *P. kluyveri* est capable d'augmenter la quantité de thiols volatils des vin.

### 3.5 *Metschnikowia pulcherrima*

#### 3.5.1 Caractéristiques de l'espèce *M. pulcherrima*

Cette espèce présente un intérêt en œnologie du fait de sa capacité à produire des enzymes extracellulaires telles que des protéases ou des  $\beta$ -glucosidases (Fernández et al., 2000; Nguyen and Panon, 1998; Oro et al., 2014; Zott et al., 2011).

Une activité antimicrobienne de *M. pulcherrima* contre les souches appartenant aux genres *Brettanomyces*, *Hanseniaspora* et *Pichia* a été mise en évidence sur milieu gélosé puis au cours de la fermentation alcoolique (Mehlomakulu et al., 2015; Nguyen and Panon, 1998; Oro et al., 2014).

En 2000, Fernández et al. ont isolé 32 souches de *M. pulcherrima* de différents vins en fermentation. Après un screening sur milieu gélosé, les 32 souches ont montré une activité protéase sur milieu contenant de la caséine (Bilinski et al., 1987) et 28 une activité  $\beta$ -glucosidase sur milieu contenant de l'arbutine (Rosi et al., 1994). Les glucosidases sont susceptibles d'hydrolyser les précurseurs d'arômes glycosylés et ainsi participer à la complexité aromatique du vin. Lors de fermentations en Sauvignon Blanc, Zott et al. (2011) ont mis en évidence que certaines souches de *M. pulcherrima* sont capables de produire des quantités de 3SH supérieures à celles de *S. cerevisiae*. L'une des deux souches de *S. cerevisiae* de cette étude est la Zymaflore X5 (Laffort Œnologie) caractérisée par une forte aptitude à libérer les thiols volatils à partir des précurseurs S-cystéinilés (Masneuf-Pomarède et al., 2006).

En culture mixte avec *S. cerevisiae*, la présence de *M. pulcherrima* entraîne une diminution de la concentration en acide acétique (Comitini et al., 2011; Morales et al., 2015; Sadoudi et al., 2012). Un effet synergique est également observé concernant la production des alcools supérieurs. De

plus, le profil aromatique des cultures mixtes est très différent de chacune des deux cultures pures, et caractérisé par des teneurs élevées en acides gras, éthyl esters, acétate de phényléthyle et acétate d'isoamyle. En co-inoculation, une mort précoce de *M. pulcherrima* est observée mais son métabolisme est plus actif : la production de métabolites secondaires ne semble pas liée à la biomasse (Sadoudi et al., 2012).

Une diminution de la concentration en éthanol a également été observée lors de cultures mixtes *S. cerevisiae*-*M. pulcherrima* (Contreras et al., 2014; Morales et al., 2015). L'utilisation d'espèces ayant un rendement en éthanol plus faible que *S. cerevisiae* présente un intérêt dans le contexte actuel de réchauffement climatique entraînant une augmentation de la quantité de sucres du raisin et donc du titre alcoométrique.

### **3.5.2 Connaissances actuelles sur l'activité protéasique de *Metschnikowia pulcherrima* et intérêts en œnologie**

Les protéases catalysent le clivage des liaisons protéiques et présentent différents intérêts en œnologie : alternative à la bentonite pour réduire le risque de casse protéique (Jolly et al., 2003b; Lagace and Bisson, 1990; Pocock et al., 2003), libération de mannoprotéines durant l'autolyse des lies contribuant à augmenter la stabilité des protéines du vin (Moine-Ledoux and Dubourdieu, 1999), libération de peptides et d'acides aminés augmentant ainsi la quantité d'azote assimilable du moût, impact au niveau aromatique... Pour être actives dans le vin, ces enzymes doivent présenter une activité à faible pH (3-3,5), en présence de SO<sub>2</sub> et à la température de vinification.

Les protéases extracellulaires des levures non-*Saccharomyces* sont peu caractérisées. Récemment, Reid et al. (2012) ont identifié et séquencé le gène MpAPr1 codant pour une protéase extracellulaire chez *Metschnikowia pulcherrima* IWB T Y1123. Le même type de gène a été retrouvé chez *Candida apicola*, également retrouvée en vinification. Le gène MpAPr1 a été retrouvé chez d'autres souches de *M. pulcherrima*. De plus, l'intensité de l'activité protéolytique n'est pas liée à la séquence du gène.

#### **3.5.2.1 La casse protéique et les traitements**

Le phénomène de casse protéique, dans les vins blancs ou rosés, est dû à l'instabilité des protéines du vin au cours du stockage, qui deviennent insolubles provoquant l'apparition d'un trouble. Cela entraîne une diminution de la valeur commerciale du vin, le trouble étant considéré par les consommateurs comme une preuve de la contamination du produit par un microorganisme

d'altération. Les protéines impliquées appartiennent à la classe des « Pathogenic-Related » (PR) protéines :  $\beta$ -glucanases, chitinases et « thaumatin-like » (TLPs) protéines et sont caractérisées par une masse moléculaire comprise entre 13 et 30 kDa et un point isoélectrique compris entre 4,1 et 5,8. Elles présentent donc une charge nette positive au pH du vin. Dans les vins rouges, les protéines sont précipitées par les tannins. Les PR protéines sont présentes dans le vin entre 50 et 400 mg/L (Hsu and Heatherbell, 1987; Lamikanra and Inyang, 1988; Waters et al., 1992).

L'utilisation de bentonite pour lutter contre le phénomène de la casse protéique est une pratique efficace et largement répandue chez les viticulteurs. Chargée négativement, la bentonite agit comme un échangeur de cations qui fixe les protéines chargées positivement. Le complexe formé peut ensuite être éliminé par soutirage (Ferreira et al., 2001). Cependant, l'utilisation de la bentonite présente certains inconvénients. En effet, pour une concentration donnée, l'efficacité du traitement n'est pas homogène sur l'ensemble des protéines présentes. Il faudrait donc appliquer plusieurs concentrations en fonction des différentes fractions protéiques pour avoir une efficacité optimale. De plus, la bentonite ne fixe pas spécifiquement les protéines ce qui implique des modifications au niveau des propriétés organoleptiques du vin (arômes, couleur). Enfin, du fait de la formation de lies, une perte de volume de 5 à 20% est généralement observée (Lagace and Bisson, 1990; Waters et al., 2005).

Depuis quelques années, plusieurs solutions sont étudiées afin de proposer aux viticulteurs des alternatives à l'utilisation de la bentonite : ultrafiltration, traitements thermiques, addition de polysaccharides... (Ferenczy, 1966; Francis et al., 1994; Hsu and Heatherbell, 1987; Pocock et al., 2003, Cabello-Pasini et al., 2005; Waters et al., 1991, 1994). Néanmoins, à ce jour aucune technique optimale n'a été retenue car elles ne permettent pas de limiter efficacement le phénomène de casse protéique, ou ont un impact négatif sur la qualité organoleptique du vin. L'utilisation de protéases sécrétées par les levures du vin présente donc un intérêt majeur.

### *3.5.2.2 Méthodes existantes de mesure de l'activité protéolytique*

Les différentes méthodes actuellement utilisées pour mesurer l'activité protéolytique des microorganismes sont basées sur l'utilisation de milieux de laboratoire, solides ou liquides, dans des conditions souvent éloignées de celles rencontrées en œnologie au cours de la fermentation alcoolique. Les géloses au lait, à la caséine ou à la gélatine sont fréquemment utilisées, l'activité protéolytique étant estimée par l'apparition d'une zone claire correspondant à l'hydrolyse du substrat autour de la colonie (Charoenchai et al., 1997; Fernández et al., 2000; Mateo et al., 2015;

Reid et al., 2012; Strauss et al., 2001). Ces méthodes nécessitent des temps d'incubation relativement longs et les résultats obtenus sont qualitatifs et ne permettent pas de différencier de façon claire l'intensité de l'activité protéolytique de différentes souches.

La quantification de cette activité enzymatique implique l'utilisation de solutions tampons composées par exemple de phosphate ou citrate-phosphate contenant des protéines, généralement la sérum albumine bovine. La présence de protéases actives entraîne une augmentation de la densité optique de la solution (Lagace and Bisson, 1990; Mateo et al., 2015). Une méthode employant la Cd-ninhydrin a également été décrite pour mesurer l'activité protéolytique (Maturano et al., 2012; Mendoza et al., 2007). Les cellules sont incubées en présence d'un tampon acide citrique-citrate contenant des protéines et le réactif Cd-ninhydrine. L'activité protéolytique est là encore déterminée par la mesure de la densité optique. Une autre méthode, utilisant la chaîne B de l'insuline oxydée comme substrat de protéase est également utilisée pour mesurer l'activité protéolytique dans les vins, après l'addition de préparations commerciales. Les extrémités NH<sub>2</sub> libérées par l'hydrolyse des protéines sont dosées par la ninhydrine (Humbert-Goffard, 2003).

Le pH n'est pas toujours ajusté à une valeur représentative du vin (3-3,5), et, même si les temps d'incubation varient en fonctions des méthodes, cela reste long et relativement difficile à mettre en œuvre. Un test simple, permettant de suivre l'activité protéolytique des levures en temps réel au cours de la fermentation alcoolique a été mis en place.

## **4 Impact de la composition en lipides du moût sur le développement des levures**

Plusieurs études ont mis en évidence que les populations de levures au cours de la fermentation alcoolique peuvent être influencées par de nombreux facteurs physico-chimiques tels que le pH, la température, l'addition de SO<sub>2</sub>, la macération à froid... (Andorra et al., 2011; Mendoza et al., 2008; Pretorius, 2000).

Dans ce travail nous étudierons l'impact de deux facteurs environnementaux sur une population de levures non-*Saccharomyces* : la supplémentation du moût en lipides *via* l'utilisation de produits commerciaux et la saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique. L'effet de l'inoculation du moût avec une souche commerciale de *S. cerevisiae* sera également étudié. En 2008, Andorrà et al. ont mis en évidence que l'inoculation de *S. cerevisiae* était suivie

rapidement par une augmentation de la proportion de cette espèce au détriment des levures non-*Saccharomyces*.

Le métabolisme lipidique chez la levure a été principalement décrit chez *S. cerevisiae*. Depuis de nombreuses années, il a été mis en évidence que cette espèce est capable d'incorporer des lipides exogènes présents dans le milieu de culture (Rodriguez et al., 1982). Depuis une dizaine d'années, quelques études se sont intéressées aux non-*Saccharomyces* (Aguilera et al., 2006; Pina et al., 2004; Torija et al., 2003).

## **4.1 Métabolisme des lipides chez la levure**

Les lipides ont un rôle essentiel dans la cellule et font notamment partie des constituants majoritaires des membranes. Parmi les composants lipidiques majeurs des membranes eucaryotes on retrouve les phospholipides, les stérols, les sphingolipides et les glycérolipides. Ils sont issus soit de la synthèse *de novo* à partir de précurseurs tels que l'acétyl-Coenzyme A (acétyl-CoA), soit de l'incorporation de lipides exogènes.

### **4.1.1 Les acides gras**

La synthèse *de novo* des acides gras a lieu essentiellement dans le cytoplasme et nécessite la présence d'acétyl-CoA. Ce précurseur est issu de la glycolyse et de la voie du pyruvate-acétaldéhyde-acétate. La condensation d'un acétyl-CoA et d'un ion bicarbonate sous l'action de l'acétyl-CoA carboxylase va permettre la formation de malonyl-CoA. L'élongation se fait sous l'action de la Fatty Acid Synthase (FAS) par la condensation successive d'unités de malonyl-CoA sur une molécule d'acétyl-CoA. Le complexe FAS est constitué de 2 sous-unités et utilise le NADPH comme co-facteur (Beopoulos et al., 2011; Erwin, 1973). Chez la levure, l'élongation s'arrête lorsque la chaîne de l'acyl-CoA atteint 14 ou 16 atomes de carbone en fonction de l'espèce. Néanmoins, des acides gras à plus courte chaîne peuvent être issus de cette voie. Chez *S. cerevisiae*, une voie de biosynthèse dans la mitochondrie a été mise en évidence (Brody et al., 1997; Schneider et al., 1997).

Les acides gras peuvent ensuite subir différentes modifications, notamment l'élongation et la désaturation. L'élongation nécessite la présence de malonyl-CoA et de plusieurs enzymes du réticulum endoplasmique. L'acide gras le plus long détecté chez la levure possède 26 atomes de carbone (Beopoulos et al., 2011; Denic and Weissman, 2007; Kohlwein et al., 2001).

Les désaturases sont des protéines hydrophobes ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Elles utilisent comme substrat les acyl-CoA ou les phospholipides possédant un

résidu acyl et nécessitent la présence d'O<sub>2</sub> moléculaire. Chez les levures, 4 désaturases différentes ont été identifiées (Beopoulos et al., 2011) :

- $\Delta 9$  : insère une première double liaison sur les acides gras C16:0 et C18:0 afin d'obtenir respectivement les acides palmitoléiques (C16 :1) et oléiques (C18 :1). Cette désaturase est la seule agissant préférentiellement sur les acides gras saturés plutôt que sur les phospholipides.
- $\Delta 12$  : insère une deuxième double liaison sur les acides gras C18:1 pour former l'acide linoléique (C18 :2)
- $\Delta 15$  : insère une double liaison sur les acides gras C18:2 pour obtenir l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3,  $\omega 3$ )
- $\Delta 6$  : insère une double liaison soit sur l'acide  $\alpha$ -linoléique soit sur l'acide oléique. Les acides gras formés sont respectivement l'acide stéaridonique (C18 :4) ou l'acide  $\gamma$ -linoléique (C18:3,  $\omega 6$ ).

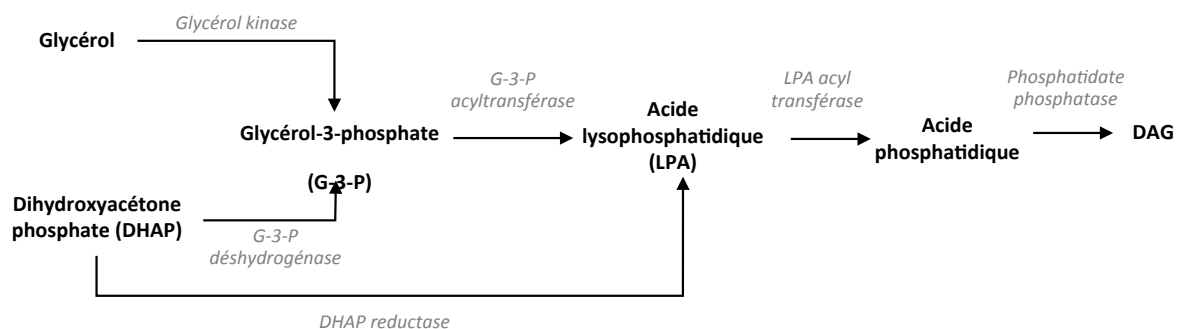
Les désaturases  $\Delta 9$  et  $\Delta 12$  sont les plus répandues chez les levures et les seules présentes chez *S. cerevisiae*. A ce jour, les 2 autres désaturases n'ont pas été décrites chez les levures en œnologie. Les acides palmitiques (C16), oléiques (C18), palmitoléiques (C16 :1), linoléiques (C18 :1) et linoléiques (C18 :2) sont principalement retrouvés (Daum et al., 1998). Les acides gras libres sont retrouvés en faible quantité mais sont nécessaires à la synthèse des lipides neutres, phospholipides, esters de stérols...

#### 4.1.2 Formation des lipides neutres et phospholipides

- **Lipides neutres**

Les acides gras peuvent être estérifiés avec du glycérol, des stérols ou des alcools pour former respectivement des acylglycérols, des esters de stérols et des cérides. Le glycérol peut être estérifié avec trois acides gras pour obtenir du triacylglycérol (TAG). Les TAG sont la forme de stockage la plus efficace chez la levure (Czabany et al., 2007; Daum et al., 1998).

Le précurseur direct des TAG est le diacylglycérol (DAG). Le DAG peut être formé selon deux voies : la voie du glycérol-3-phosphate et la voie du monoacylglycérol. Cette dernière correspond à une acylation directe du monoacylglycérol par un acylcoenzyme A et n'est pas présente chez toutes les espèces de levures. La voie du glycérol-3-phosphate est la plus répandue (figure 2).

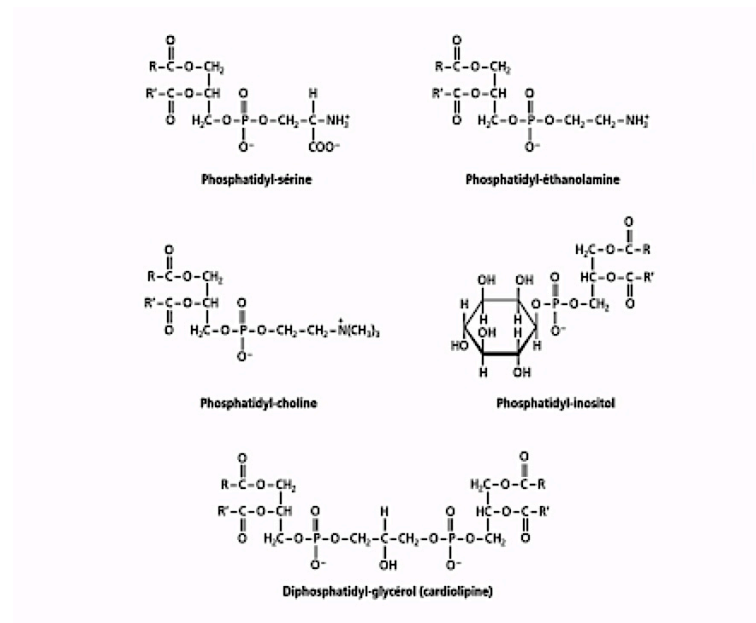


**Figure 2: Biosynthèse du diacylglycérol chez la levure (D'après Czabany et al., 2007; Daum et al., 1998, Sorger and Daum, 2003).**

Le glycérol-3-phosphate nécessaire à la synthèse de DAG peut être issu de la phosphorylation du glycérol ou de la glycolyse, tout comme le dihydroxyacétone phosphate. Les deux réactions d'acylation nécessitent la présence d'acyl-CoA. Une dernière réaction d'acylation permet d'obtenir les TAG. La synthèse de TAG est maximale pendant la phase stationnaire de croissance (Sorger and Daum, 2003).

- **Phospholipides**

Les phospholipides sont constitués de deux acides gras estérifiés en position 1 et 2 sur une molécule de glycérol et d'un groupement phosphate en position 3. Généralement, l'acide gras en position 1 est saturé, contrairement à celui en position 2 qui est le plus souvent insaturé. Les phospholipides principalement retrouvés chez la levure sont : le phosphatidy-linositol (PI), la phosphatidyl-sérine (PS), la phosphatidyl-éthanolamine (PE), la phosphatidyl-choline (PC) et le diphosphatidylglycérol (cardiolipine) (figure 3)(Daum et al., 1998).



**Figure 3: Phospholipides membranaires chez la levure (D'après Ribéreau-Gayon et al., 2012)**

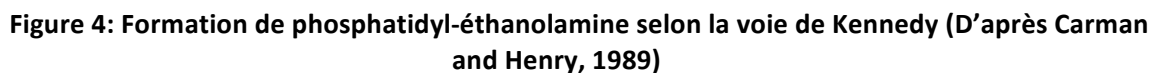
La synthèse des phospholipides a lieu essentiellement dans la mitochondrie et le reticulum endoplasmique mais peut aussi se dérouler dans l'appareil de Golgi et les gouttelettes lipidiques (Leber et al., 1995; Zinser et al., 1991).

L'acide phosphatidique est le précurseur de tous les phospholipides (figure 2). A partir de la condensation de l'acide phosphatidique et de la cytidine triphosphate va être formé le cytidine diphosphate-diacylglycérol (CDP-DAG). Le CDP-DAG est un métabolite central et essentiel pour la biosynthèse des composés lipidiques chez la levure. Chez *S. cerevisiae*, la mutation du gène *CDS1* codant pour la CDP-DAG synthase et impliqué dans la formation de CDP-DAG entraîne la mort cellulaire. Le CDP-DAG en présence d'inositol et de sérine va aboutir à la formation de phosphatidyl-inositol (PI) et de phosphatidyl-sérine (PS)(Dowhan, 1997; Shen et al., 1996).

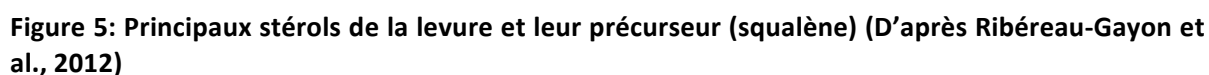
Le PI est impliqué dans la signalisation cellulaire et la réception membranaire. Il est indispensable à la synthèse de certaines protéines et notamment des PI-kinases impliquées dans le fonctionnement du noyau, le transport des macromolécules, l'organisation du cytosquelette d'actine... La PS est minoritaire chez la levure mais impliquée dans la voie de biosynthèse des deux phospholipides majoritaires, la PC et la PE. La synthèse *de novo* de PE se fait essentiellement par décarboxylation de la PS. Les PE sont des constituants essentiels des membranes cellulaires et sont impliqués dans la division et la signalisation cellulaire, l'autophagie et la phagocytose. La PC est formée à partir de la PE suite à 3 méthylations successives. Tout comme les PE, les PC sont des constituants essentiels des membranes (Daum et al., 1998).



Enfin, le phosphatidyl-glycérol (PG) est un phospholipide minoritaire chez *S. cerevisiae*. Sa formation nécessite la présence de CDP-DAG et de G-3-P. La condensation de deux unités de PG constitue la cardiolipine. Minoritaire dans la membrane plasmique, la cardiolipine est un constituant majeur de la membrane mitochondriale.



Les stérols agissent comme des régulateurs importants de la fluidité et de la perméabilité membranaire (Gaber et al., 1989). Chez *S. cerevisiae* ils sont synthétisés principalement en fin de phase exponentielle de croissance. Chez les levures, l'ergostérol est majoritaire. Le lanostérol et le zymostérol sont également retrouvés (figure 5) (Parks and Adams, 1978).



La biosynthèse des stérols (Daum et al., 1998; Parks and Casey, 1995) se fait à partir de l'acétylCoA et nécessite 20 réactions successives impliquant plus de 20 gènes différents. La condensation de deux molécules d'acétylCoA va aboutir à la formation d'acétoacétylCoA. Puis l'action de la HMG-CoA synthase et de la HMG-CoA réductase va permettre la synthèse d'acide mévalonique. Différentes réactions de phosphorylations et décarboxylations vont former le farnesyl pyrophosphate.

La condensation d'unités à cinq atomes de carbone par la squalène synthase sur le farnesyl pyrophosphate aboutit à la formation de squalène.

Le squalène est le précurseur des différents stérols de la levure. La synthèse des stérols à partir du squalène nécessite la présence d'oxygène moléculaire, pouvant être apporté sous forme de dioxygène dissout ou de lipides exogènes présents dans le milieu de culture. Le premier stérol formé est le lanostérol. A l'issue de plusieurs étapes de déméthylations, réductions et décarboxylation le zymostérol peut être synthétisé. Après isomérisation, deux désaturations successives vont ajouter une double liaison entre les carbones 5 et 6 (retrouvée dans tous les stérols) et une en C22 sur la chaîne latérale. Enfin, une réductase permet l'élimination de la double liaison présente en C24 et ainsi la formation d'ergostérol.

En plus de leur incorporation au sein des membranes, les stérols peuvent être estérifiés avec des acides gras et stockés dans les gouttelettes lipidiques. Le lanostérol et le zymostérol sont estérifiés préférentiellement par rapport à l'ergostérol.

#### **4.1.4 Sphingolipides**

Les sphingolipides sont des dérivés de la sphingosine. La sphingosine est un alcool gras possédant 18 atomes de carbones, deux groupements alcool (C1 et C3), une insaturation (C4) et un groupement amine (C2). Pour former les sphingolipides, un acide gras va être fixé par une liaison amine au niveau du groupement NH<sub>2</sub> de la sphingosine. Sur la fonction alcool primaire de cette dernière, différents types de groupements peuvent être ajoutés (choline, éthanolamine, composés glycosylés...). Chez *S. cerevisiae* le mannose-inositol phosphorylcéramide est le sphingolipide majoritaire.

Les sphingolipides sont situés principalement dans la membrane plasmique. Ils sont également retrouvés dans le Golgi et la membrane des mitochondries mais pas dans les gouttelettes lipidiques et le noyau. Leur synthèse a lieu dans le reticulum endoplasmique (Dickson and Lester, 1999).

## 4.2 Catabolisme

Différentes lipases vont permettre la dégradation des lipides stockés dans les gouttelettes lipidiques donnant lieu notamment à la libération de stérols et d'acides gras libres. Ces molécules pourront alors être redirigées vers les membranes cellulaires.

De plus, les acides gras libres vont pouvoir rejoindre la voie de biosynthèse des phospholipides ou encore être dégradés dans le peroxysome selon le mécanisme de la  $\beta$ -oxydation. Un cycle de  $\beta$ -oxydation se déroule en 4 étapes : oxydation, hydratation, déshydratation et transport vers la mitochondrie. Chaque cycle libère un acylCoA (à  $n-2$  atomes de carbone) et un acétylCoA. C'est ce dernier qui va être redirigé vers la mitochondrie et entrer dans le cycle de Krebs pour être utilisé comme source d'énergie (Beopoulos et al., 2011).

## 4.3 Lipides et fermentation alcoolique

Dans le moût, les acides gras insaturés sont majoritaires. L'acide linoléique est le plus abondant (Castela et al., 1985). Trois phytostérols sont également retrouvés : le  $\beta$ -sitostérol (majoritaire), le stigmastérol et le campestérol (Le Fur et al., 1994).

Au cours de la fermentation alcoolique, l'augmentation de la concentration en éthanol et la faible quantité d' $O_2$  dissout constituent deux stress importants auxquels la levure doit s'adapter. L'éthanol affecte certains systèmes de transport, le fonctionnement de certaines enzymes, la fluidité membranaire... (Alexandre et al., 1994; Arneborg et al., 1995; Augustin et al., 1965; Casey and Ingledew, 1986; Chi and Arneborg, 1999; Ibeas and Jimenez, 1997; Nagodawithana and Steinkraus, 1976; Salmon et al., 1993). Différentes études ont mis en évidence la corrélation entre l'augmentation du degré d'insaturation des membranes, l'augmentation de la teneur en ergostérol et la tolérance à l'éthanol chez *S. cerevisiae* (Agudo, 1992; Alexandre et al., 1994; Beaven et al., 1982; Ghareib et al., 1988; Mishra and Kaur, 1991; Mishra and Prasad, 1989; Šajbidor and Grego, 1992; Thomas et al., 1978; Walker-Caprioglio et al., 1990; You et al., 2003). La croissance en absence d'oxygène entraîne chez *S. cerevisiae* une diminution de la surface des organelles membranaires et une dilution des composés lipidiques. Cela entraîne l'activation des voies NADPH-dépendantes aboutissant à la production de formes réactives de l'oxygène, d'un stress oxydant et une chute de la viabilité (Bardi et al., 1998; Henry, 1982; Landolfo et al., 2008; Rosenfeld and Beauvoit, 2003). De plus, la présence d' $O_2$  est indispensable à la synthèse *de novo* des lipides cellulaires (Larue et al., 1980; Pfisterer et al., 1977; Strydom et al., 1982). Très peu de données sont disponibles chez les levures non-*Saccharomyces* mais il semblerait que la tolérance à l'éthanol ne

soit pas systématiquement liée à l'augmentation de la proportion d'acides gras insaturés et d'ergostérol. Ainsi, Pina et al. (2004) ont montré que l'augmentation de la proportion d'acide oléique et d'ergostérol était bien corrélée à une augmentation de la résistance à l'éthanol chez *H. guilliermondii* mais pas chez *H. uvarum* et *T. delbrueckii*. Cependant, d'autres auteurs ont mis en évidence une augmentation de la proportion d'acide linoléique chez *T. delbrueckii*, *P. membranifasciens* et *H. uvarum* lors de croissance dans un milieu contenant 4% d'éthanol. *T. delbrueckii* qui dans cette étude présente la plus faible résistance à l'éthanol possède également la plus faible proportion d'acides gras insaturés. *H. uvarum* présente une résistance à l'éthanol plus élevée que *P. membranifasciens* cependant leur composition en acides gras insaturés est similaire (Aguilera et al., 2006).

En 1982 Rodriguez et al. ont mis en évidence que *S. cerevisiae* était capable d'assimiler l'ergostérol exogène. Ces essais ont été réalisés en utilisant des mutants *S. cerevisiae* incapables de réaliser la synthèse d'ergostérol *de novo* (Rodriguez et al., 1982, 1985). 3 concentrations en ergostérol du milieu correspondant à 3 rôles différents de celui-ci dans la cellule ont été définies:

- « sparking role », concentration nécessaire pour initier la croissance cellulaire
- « domain role », concentration minimale pour une croissance active et des membranes intègres
- « bulk role », concentration à partir de laquelle les stérols ne peuvent plus être incorporés par la cellule.

Plus récemment, plusieurs études ont montré que les levures, y compris les non-*Saccharomyces*, sont capables d'assimiler les lipides exogènes au cours de la fermentation alcoolique (Beltran et al., 2008; Landolfo et al., 2010; Luparia et al., 2004; Pina et al., 2004; Redón et al., 2009; Torija et al., 2003).

L'ergostérol et les acides gras présents dans le milieu sont facilement assimilés par les levures. Les acides gras insaturés et l'ergostérol peuvent notamment permettre aux levures de pallier au manque d'oxygène lors de cultures en anaérobiose (Landolfo et al., 2010; Pina et al., 2004). L'incorporation de lipides exogènes modifie la composition membranaire des cellules. En effet, lors d'études réalisées sur *S. cerevisiae*, Redón et al. (2009) ont montré que lorsque le milieu est supplémenté en acides gras et en stérols, une diminution de la quantité totale de lipides membranaires est observée, suggérant une répression transcriptionnelle de la biosynthèse lipidique. *S. cerevisiae* est également capable d'incorporer les phytostérols du moût. Néanmoins, cela affecte sa croissance et peut donner lieu à des fermentations languissantes (Luparia et al., 2004; Rozes, 1992).

## 5 Impact du CO<sub>2</sub> dissout

L'effet du CO<sub>2</sub> sur la croissance et le développement des microorganismes a été principalement étudié chez les bactéries, particulièrement lorsqu'il est utilisé en surpression. Le CO<sub>2</sub> est surtout reconnu pour ses propriétés antimicrobiennes. Il est largement utilisé en industrie agroalimentaire pour la conservation des aliments et représente une alternative aux traitements thermiques. L'inhibition par le CO<sub>2</sub> est d'autant plus importante que la pression et la concentration en sucres augmentent et que la température et la concentration en éthanol sont faibles (Blickstad et al., 1981; Gill and Tan, 1979; King and Nagel, 1975).

La présence de CO<sub>2</sub> dans le milieu est indispensable à la croissance des microorganismes (Rockwell and Highberger, 1927). En effet, le CO<sub>2</sub> joue le double rôle de substrat des réactions de carboxylations et de produit des réactions de décarboxylations au sein du métabolisme cellulaire. Ces réactions jouent un rôle majeur lors de la néoglucogenèse et lors de la synthèse des acides nucléiques, des acides tricarboxyliques du cycle de Krebs et de certains acides aminés. La fixation du CO<sub>2</sub> par *S. cerevisiae* a notamment été observée dans différentes conditions de culture (Hartman et al., 1972; Oura et al., 1980). Une concentration en CO<sub>2</sub> trop faible entraîne une inhibition de la croissance des microorganismes et une modification de la forme des cellules (Arcay-Ledezma and Slaughter, 1984; Straskrbová et al., 1980).

### 5.1 Mécanisme d'inhibition par le CO<sub>2</sub>

Les étapes de l'inhibition des microorganismes par le CO<sub>2</sub> sont présentées sur la figure 6.

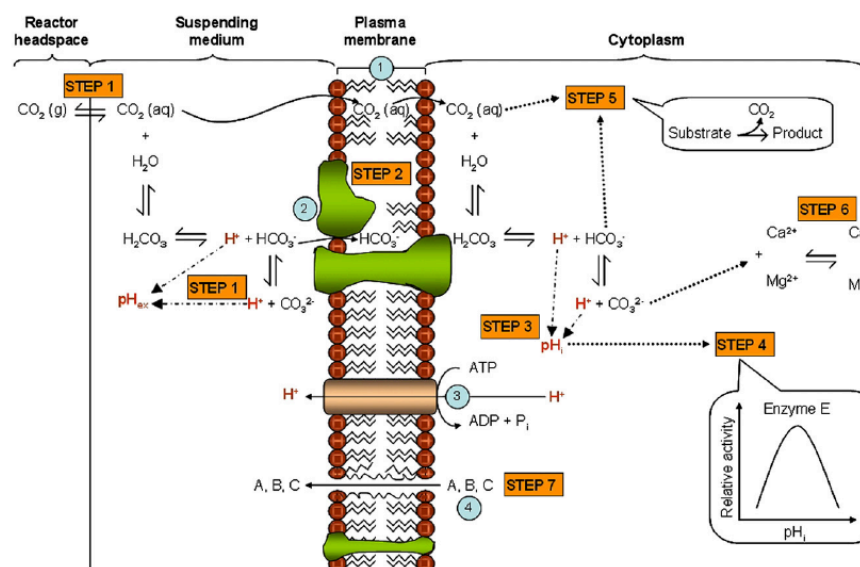
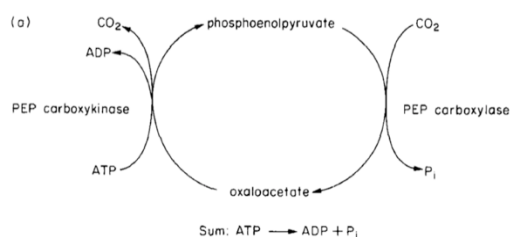


Figure 6: Mécanisme d'inhibition des microorganismes par le CO<sub>2</sub> (D'après (Garcia-Gonzalez et al., 2007))

Dans un premier temps, le CO<sub>2</sub> gazeux (CO<sub>2</sub> g) se solubilise dans le milieu de culture (CO<sub>2</sub> aq) pour former de l'acide carbonique (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). L'acide carbonique peut ensuite se dissocier en ions bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonate (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) et hydrogène (H<sup>+</sup>). Ces réactions de dissociation du CO<sub>2</sub> dépendent de la pression et de la température (step 1). La libération de protons entraîne une acidification du milieu extracellulaire. Si un ralentissement de la croissance cellulaire peut avoir lieu du fait de l'augmentation des besoins en énergie pour maintenir le pH intracellulaire, cela ne suffit pas à expliquer l'effet létal observé (Haas et al., 1989; Ho-mu et al., 1993). Il est supposé que cette diminution du pH extracellulaire faciliterait la diffusion du CO<sub>2</sub> à travers la membrane (Lin et al., 1994).

Le CO<sub>2</sub> serait en effet capable de diffuser simplement à travers la membrane plasmique et de s'y accumuler (step 2) entraînant un effet d'anesthésie (Okamoto, 1976; Spilimbergo et al., 2002). L'anesthésie survient lorsqu'un volume critique de la membrane plasmique est occupé par des molécules exogènes. Cela entraîne des modifications structurelles et fonctionnelles au sein de la membrane telles que l'altération des transports actifs (perméases) et passifs, la destruction de certains domaines membranaires (Jones and Greenfield, 1982) ou encore la modification de la composition en lipides de la membrane avec une augmentation du degré d'insaturation chez *S. cerevisiae* (Castelli et al., 1969).

Le CO<sub>2</sub> et ses formes dissociées vont ensuite s'accumuler à l'intérieur du cytoplasme (step 3). Si dans un premier temps la cellule parvient à réguler le pH intracellulaire (fonction tampon du cytoplasme, pompes à protons...), l'augmentation rapide de la concentration en CO<sub>2</sub> entraîne une acidification. Cette variation de pH va altérer le fonctionnement des enzymes intracellulaires (step 4). Les enzymes principalement affectées sont impliquées dans la glycolyse, le cycle de Krebs, le transport d'ions et d'acides aminés (Hutkins and Nannen, 1993; Jones and Greenfield, 1982; Spilimbergo et al., 2005). Le fonctionnement des différentes enzymes n'est pas seulement lié au pH intracellulaire mais également à la concentration en substrats, co-facteurs et produits. L'accumulation de CO<sub>2</sub> va avoir tendance stimuler les réactions de carboxylations et inhiber les décarboxylations (step 5). Ainsi, (Teixeira de Mattos et al., 1984) ont mis en évidence un cycle de dissipation d'énergie stimulé par la présence de CO<sub>2</sub> chez la bactérie *Klebsiella pneumoniae* (figure 7).



**Figure 7: Cycle "futile" de dissipation d'énergie en présence de  $\text{CO}_2$  (D'après (Dixon and Kell, 1989))**

De plus, la dissociation de l'ion  $\text{HCO}_3^-$  en  $\text{CO}_3^{2-}$  dans le milieu intracellulaire va entraîner la précipitation de certains ions tels que le calcium et le magnésium (step 6). Enfin, du fait de son fort pouvoir de solvation, le  $\text{CO}_2$  est capable d'extraire des cellules de nombreux composés indispensables au métabolisme (step 7) (Ho-mu et al., 1993; Lin et al., 1994).

## 5.2 Impact du $\text{CO}_2$ sur les espèces de levure retrouvées en oenologie

Dès 1976, (Chen and Gutmanis, 1976) ont observé l'effet du  $\text{CO}_2$  non pressurisé chez *S. cerevisiae* lorsque les conditions de croissance sont favorables dans le cadre de la production de biomasse en bioréacteur. Dans cette étude, la composition de l'air du bioréacteur est modifiée en remplaçant différentes proportions de diazote par du  $\text{CO}_2$ . L' $\text{O}_2$  est toujours maintenu à 20%. A partir de 40% de  $\text{CO}_2$ , une chute de population est observée. A 80% de  $\text{CO}_2$ , soit 1,1 g/L dissout, une diminution de la population de 50% est constatée ainsi qu'un ralentissement de la vitesse de fermentation (en condition aérobie).

En 2005, (Gunes et al., 2005) ont utilisé du  $\text{CO}_2$  sous haute pression (entre 6,9 et 48,3 MPa) à différentes concentrations sur du jus de raisin inoculé avec *S. cerevisiae*, *C. stellata* et *H. uvarum*. Si les trois espèces sont sensibles à une augmentation de la pression se traduisant par une augmentation de la mortalité, *C. stellata* est la plus résistante à une augmentation de la concentration en  $\text{CO}_2$ . Des différences de sensibilité vis-à-vis du  $\text{CO}_2$  sont donc observées en fonction des espèces. L'effet inhibiteur du  $\text{CO}_2$  pressurisé sur *S. cerevisiae* avait déjà été observé notamment par Arcay-Ledezma and Slaughter (1984).

## Partie 1 : Etude des interactions entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*

---



# Matériels et méthodes

## 1 Matériel biologique

Deux souches commerciales *S. cerevisiae* Zymaflore X5 et *T. delbrueckii* Zymaflore Alpha commercialisées par la société Laffort (Bordeaux, France) ont été utilisées dans ce travail. La souche X5 est caractérisée par une forte aptitude à libérer les thiols volatils à partir des précurseurs S-cystéinilés (Masneuf-Pomarède et al., 2006). L'utilisation de la souche Alpha est recommandée pour diminuer l'acidité volatile des vins liquoreux et augmenter la complexité aromatique des vins blancs secs et rosés (Renault, 2010).

## 2 Fermentations alcooliques

### 2.1 Moût

Les fermentations ont été réalisées en moût Sauvignon blanc (millésime 2012, vignobles Ducourt, Bordeaux), conservé à -20 °C. Avant chaque fermentation, la teneur en azote initiale du moût a été ajustée à 200 mg/L d'azote assimilable avec du Thiazote® (Laffort, France) afin d'assurer le bon déroulement des fermentations. Le Thiazote® est un mélange de sulfate d'ammonium et de thiamine (vitamine B1).

Le moût a été stérilisé par filtration sur membrane 0,45 µm en acétate de cellulose (Sartorius, Allemagne). La composition du moût après filtration est donnée dans le tableau 3.

**Tableau 3: Composition du Sauvignon Blanc 2012**

Sucres réducteurs	203	g/L
Titre alcoométrique probable	12,30	% vol.
Acidité totale	4,19	g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Acide L-malique	3,59	g/L
pH	3,33	
Dioxyde de soufre libre	18	mg/L
Dioxyde de soufre total	65	mg/L
Azote assimilable	202	mg/LN
Azote alpha aminé	159	mg/LN
Azote ammoniacal	43	mg/LN

## 2.2 Pré-cultures (levains)

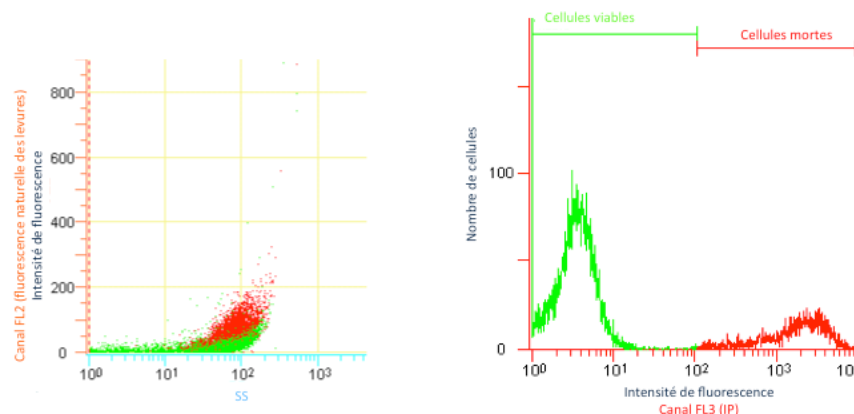
Pour les deux espèces, *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*, une étape de pré-culture ou levain a été nécessaire afin de permettre l'adaptation des levures au milieu de fermentation. Les levains ont été réalisés dans des Erlenmeyers de 100 mL contenant 50 mL de moût dilué au ½ avec de l'eau Milli-Q stérile (Millipore Darmstadt, Allemagne). Les Erlenmeyers ont ensuite étéensemencés avec 1 cm<sup>2</sup> de biomasse cultivée sur milieu YPD solide. Les levains sont ensuite incubés 24h à 24 °C sous agitation magnétique (table magnétique Variomag multipoint, Thermo Scientific) à 200 rpm pour *S. cerevisiae* et 350 rpm pour *T. delbrueckii*. Après 24h, la concentration et la viabilité cellulaire des levains ont été déterminées par cytométrie en flux.

## 2.3 Détermination de la population et de la viabilité par cytométrie en flux

Les différents échantillons ont été dilués dans du tampon McIlvaine (acide citrique 0,1M, phosphate de sodium dibasique 0,2M, pH=4). Afin de différencier les cellules vivantes des cellules mortes, 0,3% de iodure de propidium (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) ont été ajoutés à chaque échantillon. L'appareil utilisé pour la quantification (Quanta SC MPL, Beckman Coulter, Fullerton, Californie) est équipé d'un laser ayant une émission à 488 nm (22mW). Différents paramètres peuvent être mesurés lors du passage des cellules devant cette source lumineuse. Ici nous nous intéresserons particulièrement au SS ou Side Scatter et à l'émission de fluorescence.

Le SS correspond à la lumière diffusée par la cellule à 90° par rapport à la source lumineuse. Ce paramètre renseigne sur la forme et la granularité des particules. Le SS est le paramètre retenu comme déclencheur d'événement ou « trigger » pour que la mesure soit effectuée.

L'iodure de propidium pénètre à l'intérieur des cellules mortes qui vont alors émettre une fluorescence rouge contrairement aux cellules vivantes. Cette fluorescence est détectée par un photomultiplicateur sur le canal FL3 du cytomètre grâce à un filtre laissant passer les longueurs d'ondes supérieures à 670 nm (figure 8).

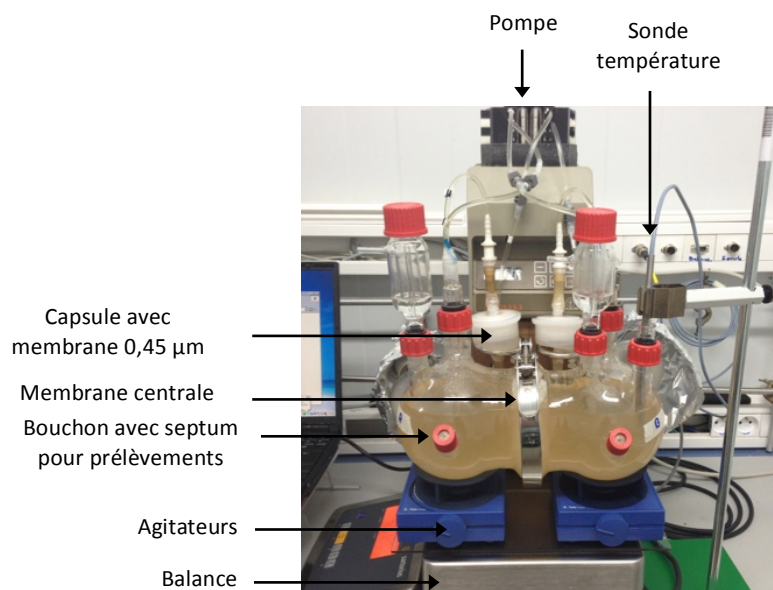
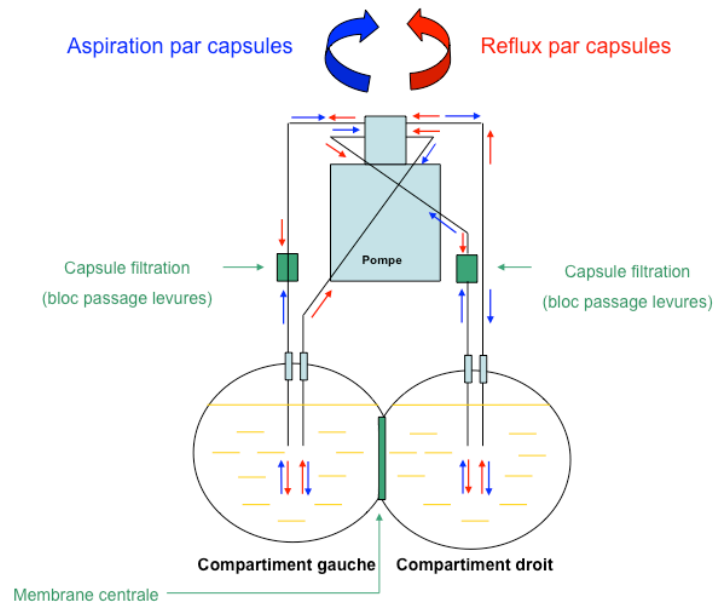


**Figure 8: Détection des levures et détermination de la viabilité par cytométrie en flux**

## **2.4 Fermentations en fermenteur double compartiment**

L'ensemble des fermentations de cette partie a été réalisé en fermenteur double compartiment (figure 9). Cet outil a été développé récemment au laboratoire (Renault et al., 2013). Un seul poste de travail était jusqu'ici disponible au laboratoire. Dans un premier temps, il a été nécessaire d'installer un deuxième fermenteur double-compartiment afin de réaliser l'ensemble des fermentations.

Le fermenteur est composé de 2 compartiments pouvant contenir chacun un volume de milieu maximal de 1,1L, soit un volume total de 2,2L. Les 2 compartiments sont séparés par une membrane centrale permettant le passage du milieu mais pas des microorganismes (Magna ester de cellulose, cut-off 0,45  $\mu\text{m}$ , Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France).



**Figure 9: Présentation du fermenteur double compartiment (D'après Renault et al., 2013)**

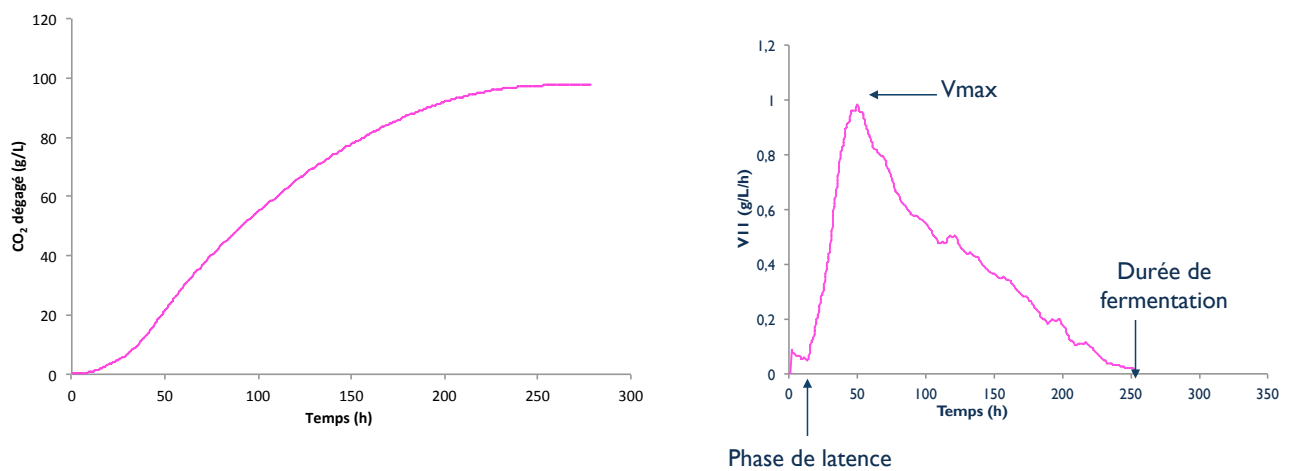
L'homogénéisation du milieu entre les deux compartiments *via* la diffusion à travers la membrane nécessite 12h. Afin d'avoir une homogénéisation plus rapide, un système de pompe péristaltique permet le passage du milieu d'un compartiment à l'autre (Minipuls 3, Gilson, France).

Deux capsules de filtration (Sartrobran P 0,45  $\mu\text{m}$  300, acétate de cellulose, Sartorius, Dublin, Irlande) contenant une membrane de porosité 0,45  $\mu\text{m}$  se trouvent au dessus de chaque

compartiment afin d'empêcher le passage des levures de l'un à l'autre. Le fonctionnement de la pompe est piloté par ordinateur (Alliance Automation, Talence, France) et est déclenché toutes les 34 minutes selon le cycle suivant : 2 minutes dans le sens horaire et 1 minute en sens inverse. Ce changement de sens permet d'éviter le colmatage des capsules. La vitesse de rotation est de 48 rpm pour un débit de 29 mL/min.

Le fermenteur est placé sur une balance de précision (Signum 1 Supreme, Sartorius, Dublin, Irlande) et deux agitateurs magnétiques.

La régulation de la température et le suivi de la cinétique de fermentation se font de manière automatisée (logiciel Labview, National Instrument, Austin, Etats-Unis). Une sonde placée à l'intérieur du fermenteur permet de contrôler la température qui est ajustée grâce à deux ampoules à infrarouge placées derrière chaque compartiment. L'acquisition de la masse du fermenteur se fait toutes les vingt minutes, permettant de mesurer le dégagement de  $\text{CO}_2$  ainsi que sa vitesse (figure 10). Cette dernière est calculée grâce au logiciel R à partir des acquisitions successives de masse. Il est alors possible de déterminer la durée de la phase de latence (temps de démarrage de la fermentation alcoolique, h), la vitesse maximale ( $V_{\text{max}}$ , g/L/h) et la durée de fermentation (h).



**Figure 10: Paramètres cinétiques mesurés au cours de la fermentation alcoolique**

Enfin, des prélèvements ont été effectués tout au long de la fermentation grâce à deux septum situés à l'avant de chaque compartiment. Les fermentations ont été effectuées à 18 °C.

## 2.5 Inoculation et modalités

Le fermenteur double compartiment est un outil adapté à l'étude des interactions entre les levures. Il permet de réaliser deux types de cultures mixtes :

- Des cultures séparées, où chaque espèce était inoculée dans un seul compartiment
- Des cultures en mélange où les deux espèces étaient inoculées dans les deux compartiments.

Qu'elles soient cultivées séparées ou en mélange, les deux espèces (ici *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*) partagent le même milieu de culture grâce à l'homogénéisation par la pompe péristaltique.

Le rapport d'inoculation *S. cerevisiae* X5/*T. delbrueckii* Alpha choisi était de 1:20 soit  $5.10^5$  cellules viables/mL pour X5 et  $1.10^7$  cellules viables/mL pour Alpha. Les mêmes concentrations ont été utilisées pour les cultures pures. Ces concentrations ont été retenues car elles permettaient à la fois une croissance de *T. delbrueckii* et une fermentation complète lorsque les deux espèces sont cultivées en mélange. Des cultures pures ont également été effectuées pour chaque espèce, en inoculant un ou deux compartiments afin de déterminer si la densité joue un rôle dans le comportement fermentaire de nos deux espèces.

Afin de pouvoir comparer les différentes modalités, les concentrations ont été calculées par rapport au volume total du fermenteur (2,2L) et non par compartiment.

L'ensemble des modalités testées est présenté sur la figure 11. Chaque condition a été réalisée en triplicata.

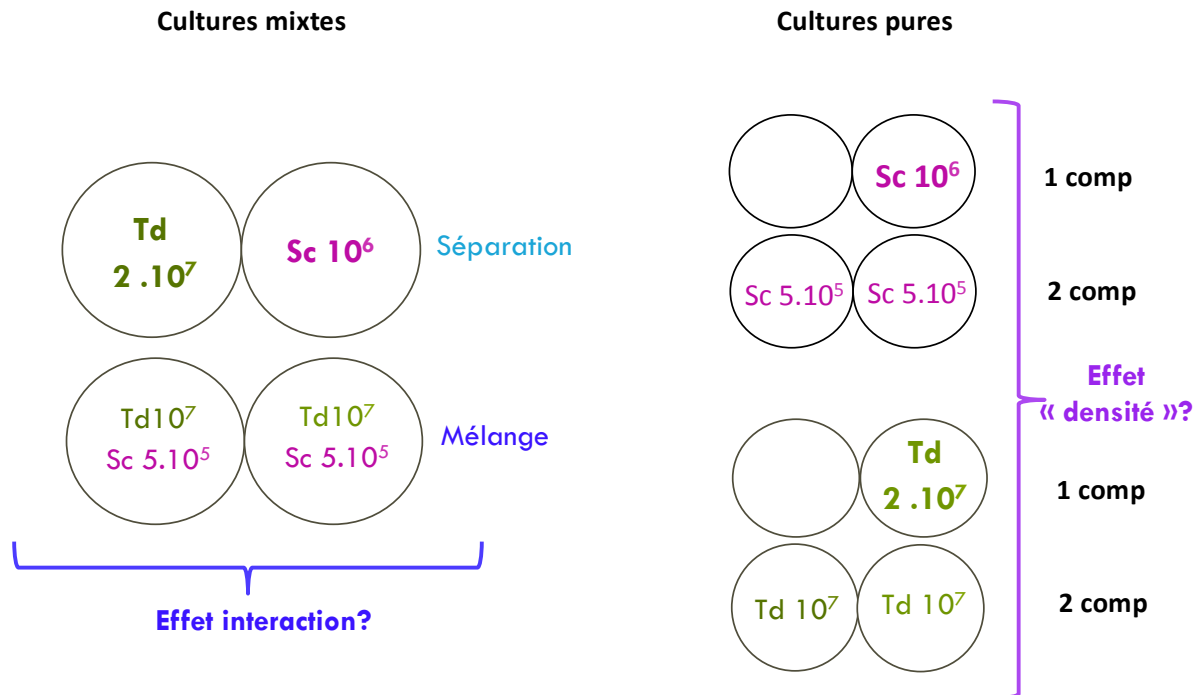


Figure 11: Différentes modalités testées lors des fermentations en fermenteur double compartiment

### 3 Suivi des populations

Le suivi des populations a été effectué par dénombrement sur milieux gélosés. Des prélèvements ont été effectués régulièrement tout au long des fermentations, tous les 10 g de  $\text{CO}_2$  dégagé.

#### 3.1 Milieu YPD solide : levures totales

Le milieu YPD permet le dénombrement des levures totales. Il contient 1% d'extrait de levure (p/v, Difco Laboratories, Detroit, Etats-Unis), 1% de bacto peptone (p/v, Difco), 2% de glucose (p/v) et 2% d'agar (p/v, Eurobio, Courtaboeuf, France).

Ce milieu a été utilisé pour les dénombrements des deux espèces indifférenciées lors des cultures mixtes en mélange et pour *S. cerevisiae* en cultures mixtes séparées et pures. Les boîtes ont été incubées 2 jours à 24 °C.

### 3.2 Milieu YPD solide + cycloheximide : *Torulaspora delbrueckii*

Afin de différencier *T. delbrueckii* de *S. cerevisiae* lors des suivis de population, le milieu YPD additionné de cycloheximide à 1 µg/mL a été utilisé (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis). A cette concentration en antibiotique, une croissance de *T. delbrueckii* a été observée après 4 jours d'incubation à 24 °C contre 2 jours sur YPD classique. La croissance de *S. cerevisiae* n'a pas été totalement inhibée mais fortement ralentie : une croissance a été observée à partir de 10 jours d'incubation.

Tous les dénombrements pour l'espèce *T. delbrueckii* ont été effectués sur ce milieu (cultures pures et mixtes). En mélange, la concentration de *S. cerevisiae* a été déterminée en calculant la différence entre les dénombrements sur milieu YPD classique et sur YPD + cycloheximide.

Les dénombrements ont été effectués sur les boîtes présentant entre 15 et 300 colonies sur deux dilutions successives.

## 4 Contrôles d'implantation

Il a été nécessaire de réaliser des contrôles d'implantation en fin de fermentation dans chaque compartiment du fermenteur afin de vérifier la présence d'une seule espèce par compartiment pour les cultures mixtes séparées et les cultures pures.

Le contrôle d'implantation a été effectué par PCR suite au prélèvement (environ 1 mL) du milieu de fermentation.

### 4.1 Extraction d'ADN

Afin de faciliter cette étape d'extraction, une carte FTA® CloneSaver™ (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) a été utilisée. Ces cartes sont constituées d'un papier Whatman traité chimiquement qui permet l'extraction et le stockage rapide d'ADN. Le dépôt des échantillons sur FTA® CloneSaver™ permet la lyse cellulaire et l'ADN de haut poids moléculaire reste immobilisé dans la matrice. Les échantillons traités étant incolores, la carte utilisée contient un indicateur qui passe du rose au blanc lorsque l'échantillon est déposé. 96 échantillons peuvent être déposés par carte et se conservent à température ambiante.

6 µL de chaque prélèvement effectué en fin de fermentation ont été déposés sur la carte FTA® CloneSaver™. Un séchage d'une heure à température ambiante est nécessaire avant utilisation ou conservation. Pour l'analyse, un prélèvement de chaque échantillon a été effectué à l'aide d'un



emporte-pièce (Harris Micro-Punch™ 1,2 mm) puis placé dans un tube PCR. Deux incubations de 5 minutes ont ensuite été effectuées dans 50 µL de tampon Tris-EDTA (Tris 1M pH8 1%, EDTA 0,5M pH8 0,5%, eau Milli-Q). Puis un rinçage a été effectué avec 50 µL d'eau milli-Q (les surnageants sont éliminés entre chaque étape). Les échantillons ont ensuite été analysés en PCR.

## 4.2 Amplification d'ADN par PCR

Deux couples d'amorces ont été utilisés : SC1 (5'-GAAACTCCACAGTGTGTG-3')/SC2 (5'-GCTTAAGTGCGCGGTCTTG -3') pour *S. cerevisiae* et Tods L2 (5'-CAAAGTCATCCAAGCCAGC-3')/ Tods R2 (5'-TTCTCAAACAATCATGTTTGGTAG-3') pour *T. delbrueckii*. Ces amorces amplifient les régions ITS de l'ADNr pour les deux espèces.

L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 20 µL contenant 0,25 µM de chaque amorce, 4 µL de Mix Taq-&GO Ready-to-use PCR Mix™ (MP Biomedical, Santa Ana, Etats-Unis), et une pastille d'ADN. Le volume a été complété à 20 µL avec de l'eau Milli-Q stérile. L'amplification a été effectuée en thermocycleur (I-cycler, Biorad, hercules, Etat-unis) selon le programme suivant: 1 minute de dénaturation initiale à 95 °C suivie de 25 cycles de dénaturation (95 °C-30 sec)-hybridation (63°C-1 min)-élongation (72 °C- 30 sec) et d'une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes.

## 4.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

L'ADN a ensuite été déposé sur gel afin de visualiser l'amplification. Le gel est préparé à 2% (p/v) d'agarose en tampon TBE 1X (acide borique 0,09M, EDTA 2mM, Tris pH8 0,09M). Dans chaque puits ont été introduits 2 µL de tampon de charge 6X (bleu de bromophénol et glycérol) pour 6 µL d'extrait d'ADN. Le marqueur de taille utilisé était le BenchTop 100bp DNA Ladder (Promega, Madison, Etats-Unis). La migration a été réalisée en TBE 1X à 70V puis le gel coloré dans un bain de bromure d'ethidium (BET) pendant 20 minutes et observé sous UV (Ingenius 3, logiciel d'acquisition Gene Sys, Syngene).

# 5 Analyses des composés en fin de fermentation

## 5.1 Analyse des thiols volatils

Le dosage des thiols volatils a été réalisé en fin de fermentation alcoolique à partir de 50 mL de vin, préalablement centrifugés à 6000 rpm durant 5 minutes. La méthode d'extraction a été décrite par Tominaga et Dubourdieu (2006).

- **Purification des thiols volatils**

Les thiols volatils présents dans l'échantillon ont été couplés avec 7,5 mL de *p*-HMB 2 mM (*p*-hydroxymercuribenzoate) préparé en tampon Trizma® base 0,1 M (2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol). L'étalon interne constitué de 1,3,3 MMB (1-méthoxy-3-méthyl-3-butanethiol) a été ajouté dans l'échantillon à raison de 1,2 nmol. Le pH a été ajusté à 7 avec une solution d'hydroxyde de sodium. Après 10 minutes d'agitation à 600 rpm, le complexe thiols/*p*-HMB a été fixé sur une colonne échangeuse d'ions (Dowex 1X2 ; 50-100 mesh pH=5 ; 1,5 x 3 cm ; réactivation à l'acide chlorhydrique 0,1 M). La colonne a ensuite été rincée par 50 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium (0,1 M, pH=7). L'ensemble des molécules non fixées sur la colonne a ainsi été éliminé. Les thiols ont été élués avec 50 mL d'une solution de cystéine (35 mM, pH=7).

- **Extraction des thiols volatils**

500 µL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés à l'éluat récupéré lors de la phase de purification. Puis deux extractions successives ont été effectuées avec 4 puis 3 mL de dichlorométhane sous agitation (5 minutes, 900 rpm). Les phases organiques (inférieures) contenant les thiols ont ensuite récupérées après transfert en ampoule à décanter. Elles ont ensuite été séchées à l'aide de sulfate de sodium anhydre (Sigma-Aldrich) puis concentrées sous azote jusqu'à 50 µL.

- **Analyse**

Les échantillons ont été analysés en chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'ensemble des caractéristiques de l'appareillage et de la méthode d'injection est présenté dans le tableau 4.

**Tableau 4: Injection des thiols volatils en GC-MS**

Appareil	Système Agilent technologies 6890, couplé à un spectromètre de masse quadripolaire MSD 5975 (Agilent Technologies, Santa Clara, Etat-Unis)
Colonne	DB-WAXETR, 50 m x 0,25 mm (d.i.), 0,22 µm (e.f.) (Agilent technologies)
Température initiale du four	40 °C
Programme de température	40°C – 1 min puis 3°C/min jusqu'à 230 °C, isotherme final de 10 min
Température d'injection	230 °C
Mode d'injection	Splitless 1 min, débit de purge 50 mL/min
Pression en tête de colonne	22 psi
Gaz vecteur	Helium
Mode d'acquisition	SIM (Selected Ion Monitoring)
Logiciel d'acquisition	MSD Chemstation (Agilent Technologies)

La quantification des différents thiols s'effectue en sélectionnant les ions spécifiques de chaque molécule. L'abondance des ions caractéristiques d'un composé est rapportée à celle des ions caractéristiques de l'étalon interne. Les différents ions utilisés sont présentés dans le tableau 5.

**Tableau 5: Ions utilisés pour la détection et la quantification des thiols volatils**

Composé	Ions utilisés pour la détection (m/z)	Ion utilisé pour la quantification (m/z)	Gamme de validation (ng/L)
3MMB (étalon interne)	134, 100	134	
3SH	134, 100	134	3,1-2000
4MSP	132, 99, 75	75	2,8-80
A3SH	101, 116	101	2,8-503

Pour chaque composé, une courbe d'étalonnage a été réalisée. Pour cela, un vin blanc a été supplémenté avec différentes concentrations du composé à doser puis analysé en GC-MS. Les rapports entre l'abondance de l'ion du composé et l'abondance de l'ion de l'étalon interne ont été calculés pour chaque concentration. Une droite de régression linéaire est ainsi obtenue, son coefficient de détermination ( $r^2$ ), son coefficient directeur (a) et son ordonnée à l'origine (b) sont déterminés. La quantification de chaque composé dans un échantillon est effectuée en appliquant la formule suivante :

$$\text{Concentration composé} = a \cdot (\text{Abondance ion composé} / \text{Abondance ion étalon interne}) + b$$

## 5.2 Analyse des esters

Le dosage des esters a été réalisé par l'équipe de biochimie des arômes de l'unité de recherche œnologie.

L'analyse des esters est basée sur la méthode de micro-extraction en phase solide dans l'espace de tête (HS-SPME) suivie par une analyse en GC-MS, mise au point au laboratoire en 2010 par Antalick et al. (2010). Cette méthode permet d'analyser simultanément 32 esters apolaires différents.

Une solution d'étalon interne est préparée en éthanol absolu constituée de butyrate d'éthyle-d5, hexanoate d'éthyle-d5, octanoate d'éthyle-d5 et cinnamate d'éthyle-d5 à 200 mg/L chacun (Scharlau, Chemie S.A., Barcelone, Espagne). 20 µl de la solution d'étalon interne sont ajoutés à 25 mL de vin préalablement centrifugés à 6000 rpm pendant 5 minutes. Après homogénéisation, 10 mL d'échantillon sont placés dans un vial SPME contenant 3,5 g de chlorure de

sodium. Le vial est serti avec une capsule métallique recouverte d'un septum en caoutchouc, homogénéisé et placé sur un distributeur automatique d'échantillons (Gerstel MPS2, Linthicum Heights Etats-Unis).

Chaque vial subit une agitation rotative de 2 minutes à 500 rpm et à 40 °C. Puis une fibre en polydiméthylsiloxane (Supelco, Bellefonte, Etats-Unis) d'épaisseur de film 100 µm est insérée dans l'espace de tête à 40 °C pendant 30 minutes, toujours sous agitation. La fibre est ainsi transférée au niveau de l'injecteur où la désorption s'effectue à 250 °C pendant 15 min.

L'ensemble des caractéristiques de l'appareillage et de la méthode d'injection en GC-MS est présenté dans le tableau 6.

**Tableau 6: Injection des esters en GC-MS**

Appareil	Système HP 5890, couplé à un spectromètre de masse quadripolaire HP 5972 (Hewlett-Packard, Palo Alto, Etat-Unis)
Colonne	BP21, 50 m x 0,33 mm (d.i.), 0,25 µm (e.f.) (SGE Analytical Science, Melbourne, Australie)
Température initiale du four	40 °C
Programme de température	40°C – 5 min puis 3°C/min jusqu'à 220 °C, isotherme final de 30 min
Température d'injection	230 °C
Mode d'injection	Splitless 45 secondes
Pression en tête de colonne	8 psi
Gaz vecteur	Helium
Mode d'acquisition	SIM (Selected Ion Monitoring)

### **5.3 Analyses physico-chimiques classiques : éthanol, sucres, acidité volatile, dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>), glycérol, azote assimilable**

Ces analyses ont été effectuées par le laboratoire SARCO (Floirac, France), accrédité COFRAC depuis 1995.

Le titre alcoométrique volumique (TAV, exprimé en %vol) est déterminé par transflexion dans le proche infra-rouge (780-3000 nm). L'éthanol présente 4 bandes d'absorption dans ce domaine à 1000, 1400, 2000 et 2800 nm.

Le dosage des sucres résiduels totaux est effectué par réfractométrie. Pour les dosages individuels du glucose et du fructose, un kit enzymatique D-Glucose/D-Fructose/Saccharose est utilisé (R-Biopharm, Darmstadt, Allemagne).

L'acidité volatile des vins correspond aux acides gras de la série acétique qui se trouvent à l'état libre ou sous forme salifiée (sels alcalins). L'acide acétique représente 95% des acides gras impliqués

dans l'acidité volatile. Parmi les autres acides gras impliqués on retrouve également les acides formique, propionique et butyrique. Lors du dosage, les acides volatils sont séparés du vin par distillation (entraînement à la vapeur d'eau). Le dosage exclut les autres acides présents dans le vin, c'est-à-dire le CO<sub>2</sub>, le SO<sub>2</sub> et éventuellement les acides sorbique et lactique. La quantité d'acidité volatile est ensuite déterminée par colorimétrie grâce à un appareil à flux continu. Elle est exprimée en g/L d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lors de l'analyse, mais, du fait de la forte proportion d'acide acétique dans les acides gras impliqués, les valeurs seront transformées en g/L d'acide acétique.

Le SO<sub>2</sub> libre et total est également déterminé par colorimétrie en flux continu (mesure de l'absorbance à 405 nm). Le SO<sub>2</sub> est utilisé en vinification pour ces différentes propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Lors de l'ajout dans le vin, une partie du SO<sub>2</sub> va se combiner aux sucres, aux aldéhydes et aux cétones. La fraction libre correspond à la fraction active.

Le glycérol est déterminé par méthode enzymatique grâce au kit R-Biopharm.

La fraction de l'azote assimilable par la levure du vin est constituée de l'azote α-aminé (acides aminés primaires) et l'azote ammoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). L'azote α-aminé est déterminé selon la méthode de Dukes and Butzke, (1998) par colorimétrie. L'azote ammoniacal est dosé grâce au kit enzymatique NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (R-Biopharm).

## 6 Calcul des paramètres de croissance et de fermentation alcoolique - Analyse statistique

### 6.1 Calcul des paramètres

Pour chaque fermentation, différents paramètres ont été calculés sur les courbes de croissance et de dégagement de CO<sub>2</sub> à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2008).

- **Durée de la phase de latence de croissance (temps entre l'inoculation et le démarrage de la croissance, h) et capacité biotique (ou population maximale)**

Les courbes de croissances obtenues à partir des dénombrements sur milieux gélosés ont été ajustées sur le modèle log logistique à 3 paramètres (Albertin et al., 2011):

$$N_t = \frac{K \cdot N_0 \cdot e^{rt}}{K + N_0 \cdot (e^{rt} - 1)}$$

N<sub>t</sub> : population à un instant t (UFC/mL), K : capacité biotique (UFC/mL), N<sub>0</sub> : population initiale (UFC/mL), r : taux de croissance (nombre de divisions par heure)

A partir de ce modèle, la dérivée seconde a été calculée et permet d'obtenir le premier et le dernier point d'inflexion de la courbe. Le temps correspondant au premier point d'inflexion correspond à la durée de la phase de latence de croissance. La capacité biotique a également été déterminée grâce à ce modèle.

- **Pourcentage de mortalité**

Le pourcentage de mortalité a été déterminé selon le calcul suivant :

$$\% \text{ Mortalité} = 1 - \left( \frac{N_{\min}}{K} \right) \times 100$$

K : capacité biotique (UFC/mL), Nmin : population minimale en fin de fermentation

- **Durée de la phase de latence de fermentation**

La durée de la phase de latence de fermentation correspondait au temps nécessaire pour obtenir une quantité de CO<sub>2</sub> dégagé supérieure à 2 g/L.

- **Vitesse maximale de fermentation (Vmax, en g/L/h)**

La courbe de dégagement de CO<sub>2</sub> a été lissée grâce à la fonction « loess » (local polynomial regression fitting). A chaque point la vitesse instantanée de dégagement de CO<sub>2</sub> (dCO<sub>2</sub>/dt) a été calculée puis la vitesse V11 correspondant à 11 points successifs a été déterminée par lissage polynomial. La vitesse maximale de fermentation était la valeur la plus élevée des V11.

## 6.2 Analyse statistiques

L'absence d'homocédasticité des variances nous a conduit à appliquer un test de Kruskal-Wallis pour comparer les paramètres de croissance, de cinétiques ainsi que les composés des vins finis. Le test de Kruskal-Wallis est l'équivalent de l'ANOVA en test non paramétrique.

## Résultats et Discussion

Les interactions entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* lors de co-inoculation en fermenteur double compartiment ont déjà été étudiées au laboratoire (Renault et al., 2013). Ces travaux ont permis de mettre en évidence la mort précoce de *T. delbrueckii* lorsque les deux espèces sont cultivées en mélange, suggérant l'existence d'interactions impliquant le cell-cell contact.

Afin d'approfondir les connaissances sur les interactions entre ces deux espèces, de nouveaux essais ont été réalisés. Plusieurs modifications ont été apportées par rapport aux travaux précédents :

- Tout d'abord, lors des cultures pures, *T. delbrueckii* ou *S. cerevisiae* ont été inoculées soit dans un seul, soit dans les deux compartiments du fermenteur. Ces deux conditions ont permis de déterminer si la densité de cellules au sein d'un compartiment avait un impact sur le développement des deux espèces (durée de la phase de latence, capacité biotique...). L'effet de la densité n'avait pas été étudié lors des essais précédemment réalisés au laboratoire.
- De plus, même si il s'agit des mêmes espèces, le couple de souches utilisé est différent. Ici, les deux souches utilisées, commercialisées par la société Laffort, étaient *T. delbrueckii* Zymaflore Alpha et *S. cerevisiae* Zymaflore X5.
- Le rapport d'inoculation de 20 :1 ( $10^7/5.10^5$  cellules viables/mL) en faveur de *T. delbrueckii* appliqué lors de nos fermentations a été choisi pour permettre une croissance de cette dernière, ce qui n'avait pas été observé auparavant.
- L'ensemble des fermentations est réalisé en moût et non en milieu synthétique ce qui nous a permis d'analyser la composition en esters et en thiols volatils du vin.

Différents types de cultures pures et mixtes (séparées ou en mélange) ont été testés dans cette partie (figure 11). Pour l'ensemble des modalités, les concentrations de chaque espèce sont calculées par rapport au volume total du fermenteur et non par rapport au volume d'un compartiment. Dans le cas de la culture mixte avec séparation, chaque espèce est deux fois plus concentrée au sein d'un compartiment par rapport à la culture mixte en mélange. Dans la suite de ce manuscrit, nous parlerons de « densité » cellulaire plus importante de chaque espèce au sein d'un compartiment dans le cas de la culture mixte avec séparation. La comparaison des cultures mixtes avec séparation ou en mélange a permis d'étudier les interactions entre les deux espèces.

Pour chaque espèce, deux types de cultures pures ont également été réalisées : soit les levures sont inoculées dans un seul compartiment du fermenteur (1 comp) soit dans les deux compartiments (2 comp). La comparaison de ces deux types de cultures pures nous a permis de déterminer s'il existait un effet lié à la « densité » cellulaire au sein des compartiments.

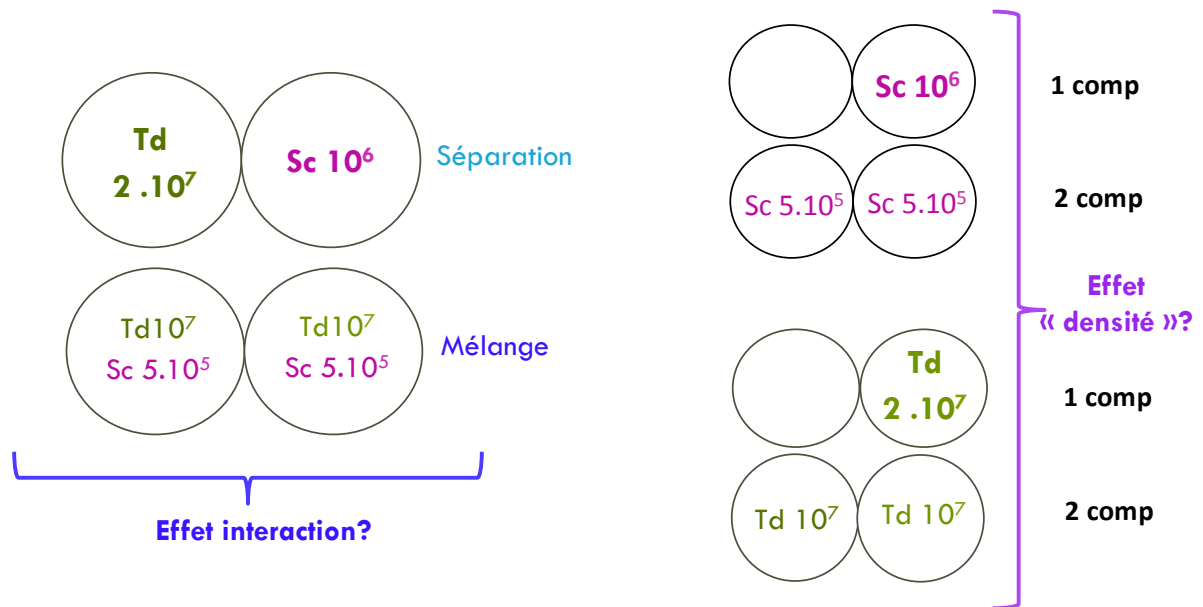


Figure 11 : Différentes modalités testées lors des fermentations en fermenteur double compartiment

Pour chaque fermentation, différents paramètres de croissance ont été calculés pour chacune des espèces : durée de la phase de latence de croissance (h), population maximale (K, UFC/mL), taux de mortalité (nombre de cellules mortes/h), durée de la phase de latence de fermentation (h), vitesse maximale de fermentation ( $V_{max}$ , g/L/h). En fin de fermentation alcoolique, les thiols volatils et les esters ont été dosés dans les vins. L'ensemble des résultats est présenté en annexe 1.

## 1 Effet densité

Afin de déterminer si les différences observées sont dues à l'effet densité, les modalités correspondant aux cultures pures ont été comparées 2 à 2 : *S.cerevisiae* inoculée dans 1 compartiment - *S.cerevisiae* inoculée dans 2 compartiments (modalités Sc 1 comp- Sc 2 comp) et *T. delbrueckii* inoculée dans 1 compartiment - *T. delbrueckii* inoculée dans 2 compartiments

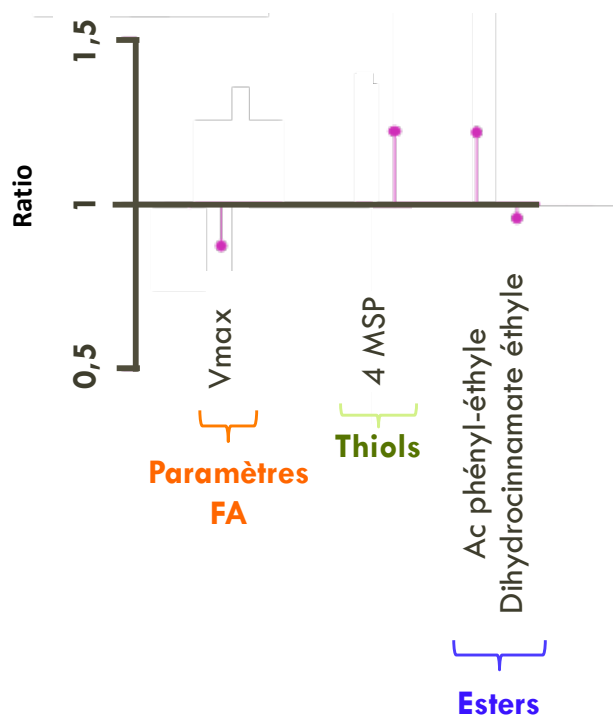


(modalités Td 1 comp -Td 2 comp). Pour chaque paramètre calculé ou composé dosé, le ratio suivant a été calculé :

$$R = \frac{\text{Valeur 1 compartiment}}{\text{Valeur 2 compartiments}}$$

Lorsque ce ratio est proche de 1, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs obtenues dans le cas de l'inoculation dans 1 ou 2 compartiments. Afin de déterminer si ce ratio est significativement différent de 1, le test de Kruskal-Wallis a été utilisé.

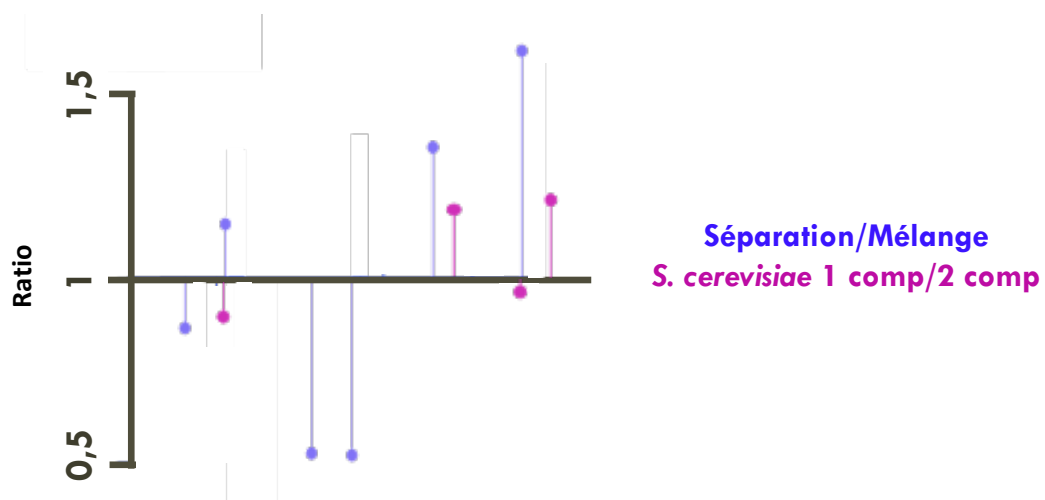
Aucun effet lié à la densité n'a été observé chez *T. delbrueckii* pour tous les paramètres de croissance, de fermentation et composés étudiés. La figure 12 présente pour *S. cerevisiae* les paramètres et composés présentant une différence significative (test de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). Pour chaque paramètre ou composé est représenté le rapport entre la valeur obtenue pour la modalité 1 compartiment et celle obtenue pour la modalité 2 compartiments. Nous pouvons prendre l'exemple de deux paramètres de cinétique fermentaire chez *S. cerevisiae* : la durée de fermentation et la Vmax. Pour la modalité 1 compartiment, la durée de fermentation est de 208h et de 191h pour la modalité deux compartiments soit un rapport égal à  $208/110=1,05$ . Le test de Kruskal-Wallis n'ayant pas mis en évidence de différence significative pour ce paramètre, il n'apparaît pas sur le diagramme. En revanche, Pour la modalité 1 compartiment, la Vmax atteint une valeur de 0,96 g de CO<sub>2</sub> dégagé/L/h contre 1,10 g de CO<sub>2</sub> dégagé/L/h pour la modalité 2 compartiments soit un rapport égal à  $0,96/1,10=0,87$ . La différence au niveau du Vmax entre les modalités *S. cerevisiae* 1 compartiment et *S. cerevisiae* 2 compartiments est significative au seuil de 5%, ce paramètre apparaît sur le diagramme.



**Figure 12: Comparaison des modalités avec inoculation de chaque espèce dans un seul ou deux compartiments du fermenteur (culture pures). Présentation des paramètres et composés présentant une différence significative ( $p < 0,05$ ) lors de la comparaison des 2 modalités Sc 1 comp et Sc 2 comp.**

Sc 1 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Sc 2 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans les 2 compartiments du bioréacteur (culture pure). Vmax : vitesse maximale de fermentation alcoolique, K-S. *cerevisiae* : capacité biotique de *S. cerevisiae*. Pour chaque paramètre ou composé, le rapport entre la valeur moyenne obtenue pour la modalité Sc 1 comp et celle obtenue pour la modalité Sc 2 comp est représenté.

Les résultats montrent qu'il existe bien un effet lié à la densité cellulaire dans les compartiments chez *S. cerevisiae* pour 4 paramètres et composés. En effet, la vitesse maximale de fermentation (Vmax) et la concentration en dihydrocinnamate d'éthyle de *S. cerevisiae* sont plus faibles lorsqu'elle est inoculée dans un seul compartiment. De plus, une production plus élevée de 4MSP et d'acétate de phényl-éthyle est observée lorsque cette espèce est inoculée dans les 2 compartiments du fermenteur. En fonction de l'espèce, du paramètre, ou encore du composé, l'effet lié à la densité cellulaire n'est donc pas similaire. Lors de la comparaison des cultures séparées (modalité « séparation ») et mélangées (modalité « mélange ») des différences ont également été observées (figure 13).



**Figure 13: Effet densité et interactions. Présentation des paramètres et composés présentant une différence significative ( $p < 0,05$ ) lors des comparaisons des modalités « séparation » et « mélange » et des modalités Sc 1 comp et Sc 2 comp.**

Séparation : les 2 espèces sont inoculées dans un seul compartiment du bioréacteur (culture mixte), Mélange : les 2 espèces sont inoculées dans les 2 compartiments du bioréacteur (culture mixte). Sc 1 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Sc 2 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans les deux compartiments du bioréacteur (culture pure). Vmax : vitesse maximale de fermentation alcoolique, K-S. *cerevisiae* : capacité biotique de *S. cerevisiae*. Pour chaque paramètre et composé, les rapports entre la valeur moyenne obtenue pour la modalité Séparation et celle obtenue pour la modalité Mélange et la valeur moyenne obtenue pour la modalité Sc 1 comp et celle obtenue pour la modalité Sc 2 comp sont représentés.

La comparaison des cultures séparées et mélangées montre que la durée de fermentation et la population maximale de *S. cerevisiae* (K-S. *cerevisiae*) sont plus faibles lorsque les deux espèces sont cultivées séparément. En revanche, le taux de mortalité de *T. delbrueckii* est plus élevé, la production de 3SH et la concentration en  $\text{SO}_2$  sont plus élevées quand les espèces sont cultivées en mélange. Pour ces 5 paramètres et composés, aucune différence n'avait été observée entre les cultures pures 1 et 2 compartiments. Les différences sont donc dues aux interactions entre espèces.

Nous pouvons également constater que la vitesse maximale de fermentation et la production de dihydrocinnamate d'éthyle sont plus importantes pour la modalité « séparation ». Des différences ont été également observées lors de la comparaison des cultures pures de *S. cerevisiae* (Sc 1 comp et Sc 2 comp) pour ces deux paramètres (Figure 12). Néanmoins les variations entre cultures pures et cultures mixtes sont systématiquement opposées. En effet, lorsque les espèces sont cultivées en mélange, la densité cellulaire de chaque espèce doit être comparée à la modalité 1 compartiment en culture pure et à la modalité 2 compartiments lorsqu'elles sont cultivées

séparément. Ici encore, les différences observées sont donc liées aux interactions entre les deux espèces.

La comparaison des 6 types de fermentations 2 à 2 ( Sc 1 comp , Sc 2 comp , Td 1 comp, Td 2 comp , « séparation » et « mélange ») a permis de mettre en évidence l'existence d'un effet densité pour l'espèce *S. cerevisiae* uniquement. En revanche, lors de la comparaison des cultures mixtes aux 2 cultures pures de *S. cerevisiae* l'effet densité est « masqué » par l'effet lié aux interactions entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*.

## **2 Etude des interactions entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii***

Pour l'ensemble des paramètres étudiés, la modalité « séparation » sera comparée aux cultures pures inoculées dans 1 seul compartiment du bioréacteur (Sc 1 comp et Td 1 comp) et la modalité « mélange » aux cultures pures inoculées dans les 2 compartiments (Sc 2 comp et Td 2 comp). Si aucune différence n'est observée entre les cultures pures 1 et 2 compartiments pour une espèce, seule la valeur moyenne est représentée.

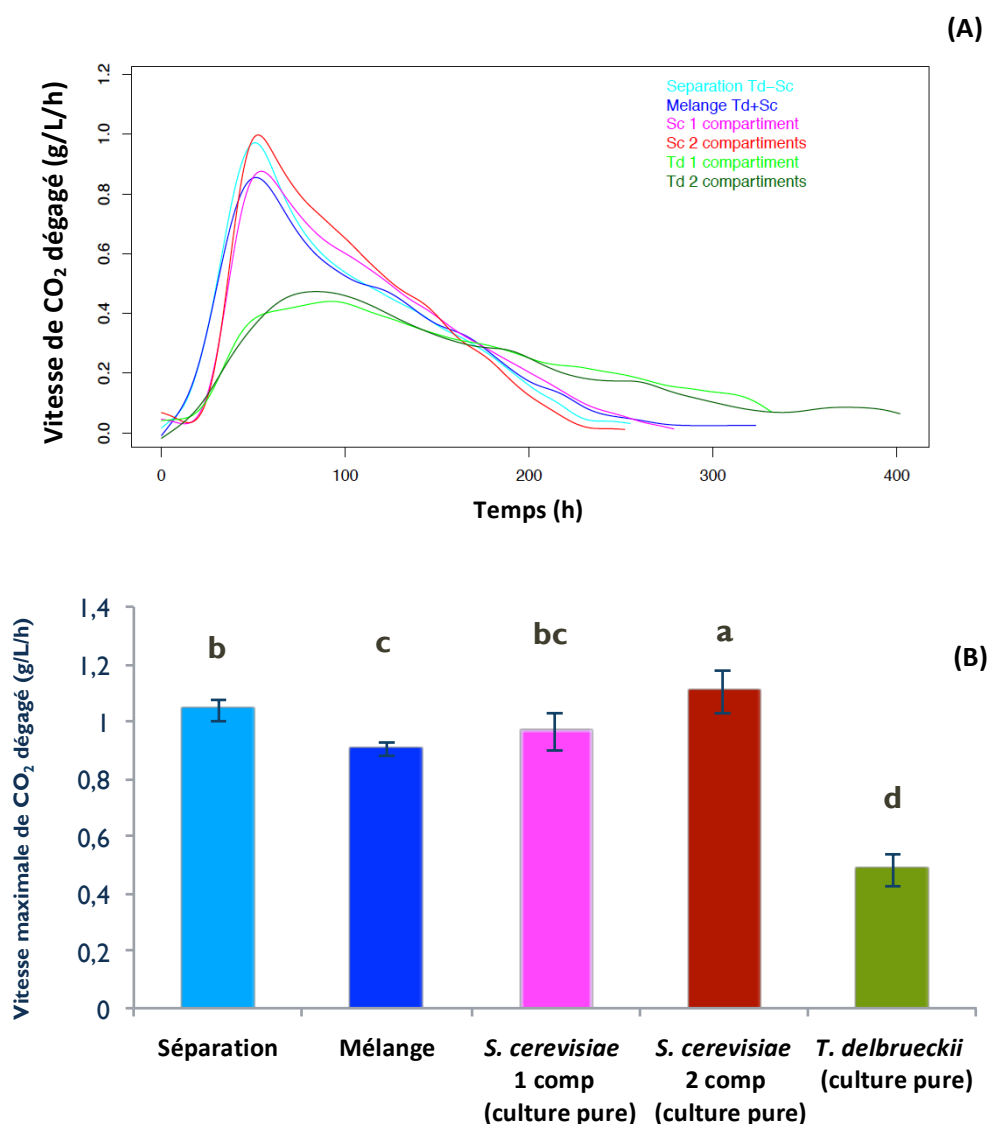
La comparaison entre les modalités « séparation » et « mélange » permettra d'étudier le type d'interaction mis en jeu.

### **2.1 Cinétiques de fermentation alcoolique**

Les cinétiques de fermentation alcoolique sont présentées sur la figure 14A. A l'exception des cultures pures de *T. delbrueckii*, la totalité des sucres a été consommée avec une production d'éthanol similaire comprise entre 11,36% et 11,58% v/v (annexe 1). Pour la culture pure de *T. delbrueckii* entre 18 et 24 g/L de sucres résiduels sont présents en fin de fermentation (environ 10,2% v/v d'alcool formé). La durée de la phase de latence de fermentation est similaire pour l'ensemble des modalités.

*T. delbrueckii* est caractérisée par une  $V_{max}$  (0,5 g CO<sub>2</sub> dégagé/L/h) beaucoup plus faible que *S. cerevisiae* (entre 0,9 et 1,1 g CO<sub>2</sub> dégagé/L/h selon les modalités Sc 1 comp et Sc 2 comp, figure 14B). Les valeurs de  $V_{max}$  observées entre la modalité séparée et le témoin *S. cerevisiae* (1 comp) sont similaires (1 g CO<sub>2</sub> dégagé/L/h). En revanche, en mélange la  $V_{max}$  est plus faible que lorsque les 2 espèces sont cultivées séparément (-13%) ou par rapport aux cultures pures de *S. cerevisiae* 2 compartiments (-18%). Cette diminution du  $V_{max}$  est cohérente avec l'augmentation de la durée de fermentation observée en mélange (324 h en mélange, 262 h avec séparation, annexe 1). Cette

variation au niveau du  $V_{max}$  en cultures mixtes a déjà été observée par Renault et al., (2013) lors d'essais en fermenteur double compartiments avec un autre couple *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*.



**Figure 14: Vitesse de dégagement de CO<sub>2</sub> au cours du temps (A) et vitesse maximale de dégagement du CO<sub>2</sub> ( $V_{max}$ ) (B) des cultures pures et mixtes**

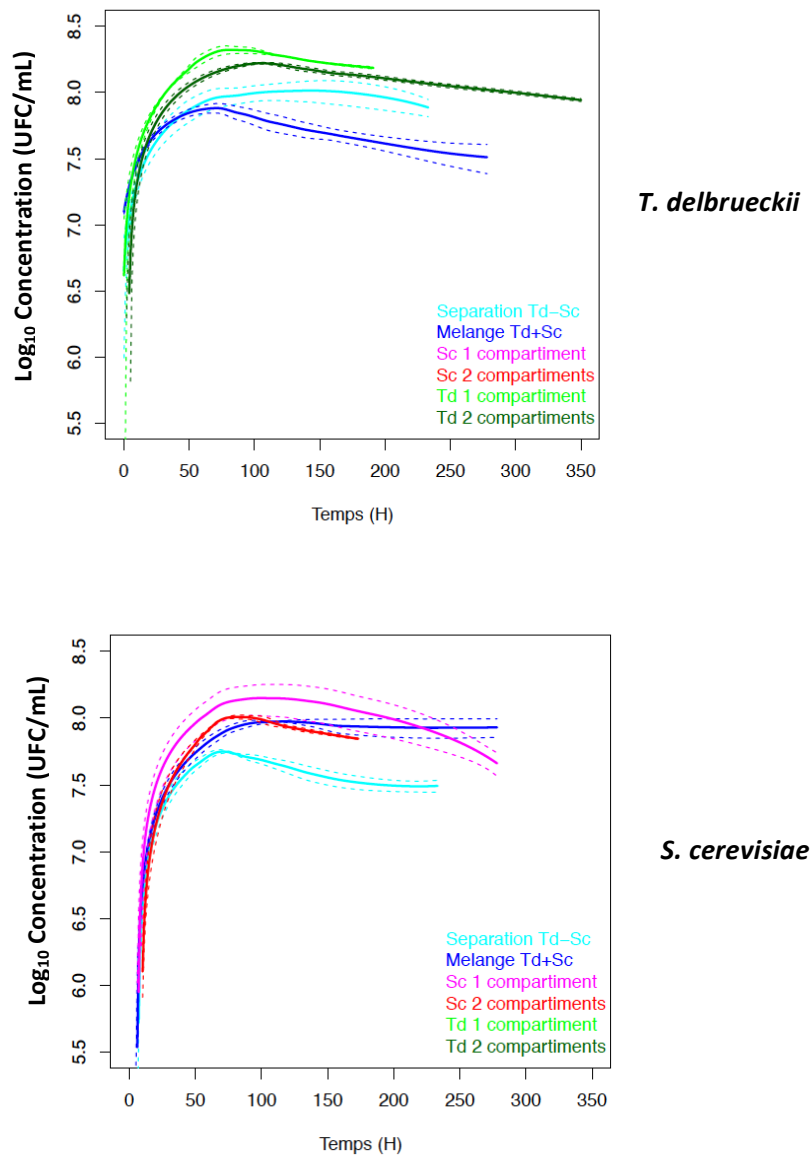
(A) : le lissage des cinétiques de fermentation a été réalisé grâce au logiciel R. Les cinétiques de fermentations moyennes sont représentées pour chaque modalité.

(B) : Les valeurs moyennes des 3 répétitions sont représentées, les barres d'erreur représentent les écart-types.

Séparation : les 2 espèces sont inoculées dans un seul compartiment du bioréacteur (culture mixte), Mélange : les 2 espèces sont inoculées dans les 2 compartiments du bioréacteur (culture mixte). Sc 1 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Sc 2 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans les deux compartiments du bioréacteur (culture pure). *T. delbrueckii* : cultures pures. Pour cette espèce, en culture pure, les vitesses maximales de fermentation étaient similaires que *T. delbrueckii* soit inoculée dans 1 seul ou dans les 2 compartiments du bioréacteur. La valeur moyenne des deux compartiments est représentée ici.

## 2.2 Suivi des populations

Le suivi des populations a été effectué par dénombrement sur milieu gélosé YPD pour le dénombrement des levures totales ou YPD + cycloheximide pour le dénombrement spécifique de *T. delbrueckii*. Les résultats des cinétiques de croissance des deux espèces sont présentés sur la figure 15.



**Figure 15: Cinétiques de croissance en de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* en fermenteur double compartiment des cultures pures et mixtes**

Le trait plein représente les cinétiques de croissance moyennes à l'issue des 3 répétitions et les pointillés l'écart-type. Des prélèvements ont été effectués toutes les 24h afin de réaliser le suivi des populations. Pour chaque espèce et modalité, les concentrations ont été calculées par rapport au volume total du bioréacteur (2,2L) et non par compartiment. Le lissage des courbes a été réalisé grâce au logiciel R.

Séparation Td-Sc : les 2 espèces sont inoculées dans un seul compartiment du bioréacteur (culture mixte), Mélange Td+Sc : les 2 espèces sont inoculées dans les 2 compartiments du bioréacteur (culture mixte). Sc 1 compartiment : *S. cerevisiae* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Sc 2 compartiments : *S. cerevisiae* est inoculée dans les deux compartiments du bioréacteur (culture pure). Td 1 compartiment : *T. delbrueckii* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Td 2 compartiments : *T. delbrueckii* est inoculée dans les deux compartiments du bioréacteur (culture pure).

Pour *T. delbrueckii*, le temps de démarrage de la croissance (phase de latence de croissance), le taux de croissance et la capacité biotique sont similaires quelle que soit la modalité testée. En revanche, le pourcentage de mortalité de *T. delbrueckii* est deux fois plus élevé lorsqu'elle est cultivée en mélange avec *S. cerevisiae*, par rapport aux cultures pures et à la modalité mixte avec séparation (0,76 contre 0,34, figure 16).

Concernant la cinétique de croissance de *S. cerevisiae*, un seul paramètre est également impacté par la présence de la séparation : la capacité biotique (figure 17). En effet, lorsque les deux espèces sont cultivées séparément, *S. cerevisiae* atteint une population maximale environ 2 fois moins importante ( $5,8 \cdot 10^7$  UFC/mL) qu'en mélange et en cultures pures (entre 1 et  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL).

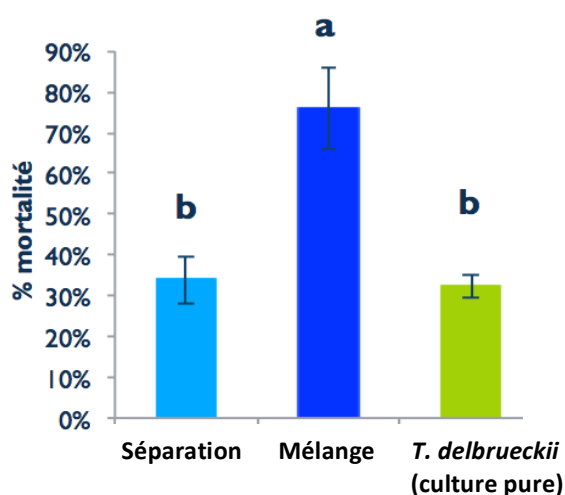


Figure 16 : Pourcentage de mortalité de *T. delbrueckii*

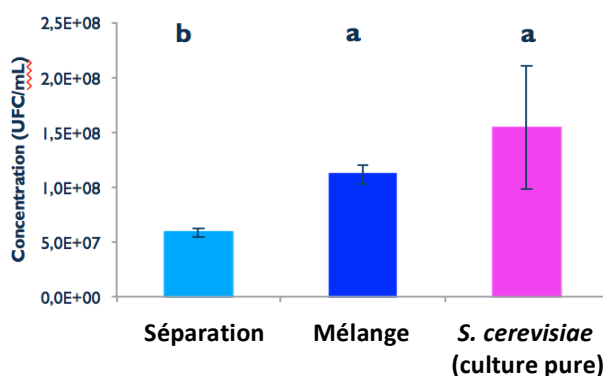


Figure 17 : Capacité biotique de *S. cerevisiae*

Les valeurs moyennes des 3 répétitions sont représentées, les barres d'erreur représentent les écart-types.

Séparation : les 2 espèces sont inoculées dans un seul compartiment du bioréacteur (culture mixte), Mélange : les 2 espèces sont inoculées dans les 2 compartiments du bioréacteur (culture mixte). *T. delbrueckii* culture pure : pour cette espèce, en culture pure, les % de mortalité étaient similaires que *T. delbrueckii* soit inoculée dans 1 seul ou dans les 2 compartiments du bioréacteur. La valeur moyenne des deux compartiments est représentée ici. *S. cerevisiae* culture pure : pour cette espèce, en culture pure, les capacités biotiques étaient similaires que *S. cerevisiae* soit inoculée dans 1 seul ou dans les 2 compartiments du bioréacteur. La valeur moyenne des deux compartiments est représentée ici.

Le % de mortalité a été déterminé selon le calcul suivant :  $1 - (N_{min}/\text{Capacité biotique}) \times 100$ , avec  $N_{min}$  = population minimale en fin de fermentation alcoolique.

A l'issue de la fermentation alcoolique, deux familles de composés aromatiques ont été dosées, les thiols volatils et les esters. Différentes analyses physico-chimiques ont également été effectuées telles que la concentration en SO<sub>2</sub> ou la production d'acidité volatile. L'ensemble des résultats est présenté en annexe 1.

## **2.3 Analyses des composés aromatiques et physico-chimiques en fin de fermentation**

Comme précédemment, la modalité « séparation » sera comparée aux cultures pures inoculées dans 1 compartiment (Sc 1 comp et Td 1 comp) et la modalité « mélange » aux cultures pures inoculées dans 2 compartiments (Sc 2 comp et Td 2 comp). Si aucune différence n'est observée entre les cultures pures 1 et 2 compartiments pour une espèce, seule la valeur moyenne est représentée.

### **2.3.1 Thiols volatils**

Les thiols volatils sont des composés aromatiques contribuant aux notes fruitées de nombreux vins blancs et particulièrement au Sauvignon blanc. Parmi eux, deux sont retrouvés majoritairement dans le Sauvignon Blanc : la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP, descripteur buis et genêt) et le 3-sulfanylhéxan-1-ol (3SH descripteur fruit de la passion et pamplemousse).

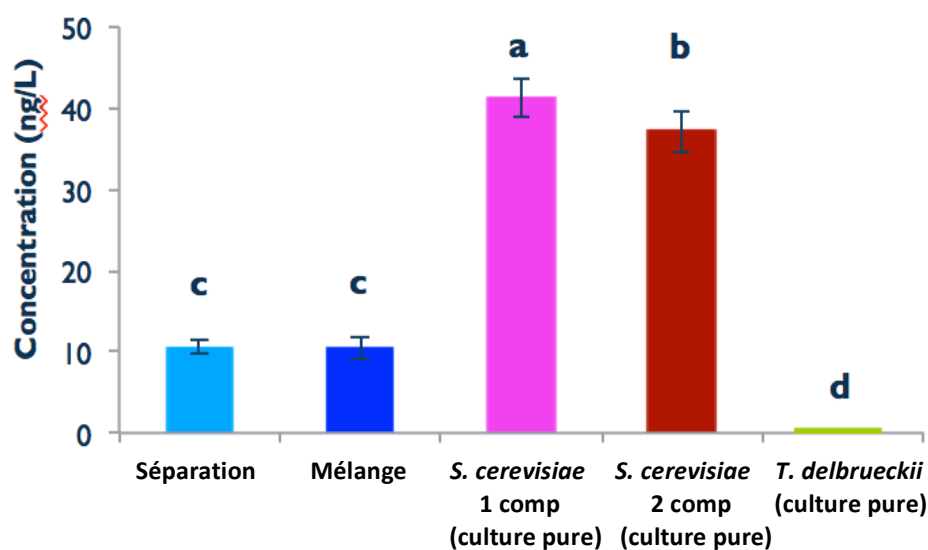
Le dosage des thiols volatils (4MSP et 3SH) a été effectué par GC-MS. Les résultats sont présentés sur la figure 18.

Conformément à ce qui a été observé lors d'études précédentes (Sadoudi et al., 2012; Zott et al., 2011), *T. delbrueckii* ne produit pas ou peu de 4MSP contrairement à *S. cerevisiae*. Nous pouvons également constater que lors des cultures pures de *S. cerevisiae*, la production de 4MSP est supérieure lorsque cette espèce est inoculée dans un seul compartiment (+ 9,5% par rapport à la culture *S. cerevisiae* 2 compartiments). Dans les cultures mixtes (séparation ou mélange) les concentrations en 4MSP sont identiques et sont environ 4 fois plus faibles que dans les cultures pures de *S. cerevisiae*.

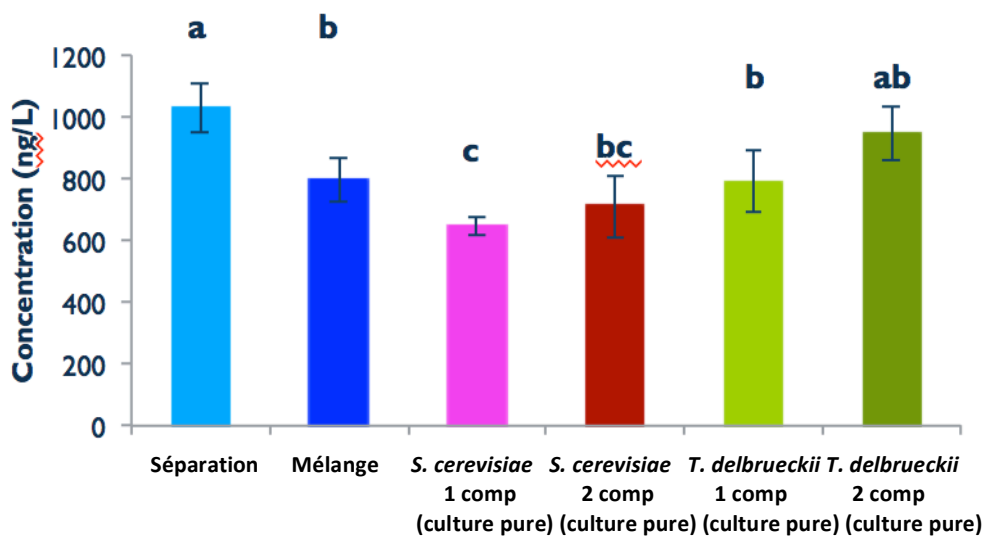
Les concentrations en 3SH sont identiques dans les cultures pures lorsque l'inoculation a lieu dans un ou deux compartiments et ce pour les deux espèces. Concernant les cultures mixtes, lorsque les deux espèces sont cultivées séparément, un effet synergique est observé (+ 61% par rapport à la culture pure de *S. cerevisiae* un compartiment) au niveau de la libération de 3SH. Dans les cultures mixtes en mélange, la concentration finale en 3SH est identique à celle observée dans la culture pure de *S. cerevisiae* 2 compartiments et à celles des cultures pures de *T. delbrueckii*



#### 4 MSP



#### 3 SH



Les valeurs moyennes des 3 répétitions sont représentées, les barres d'erreur représentent les écart-types.

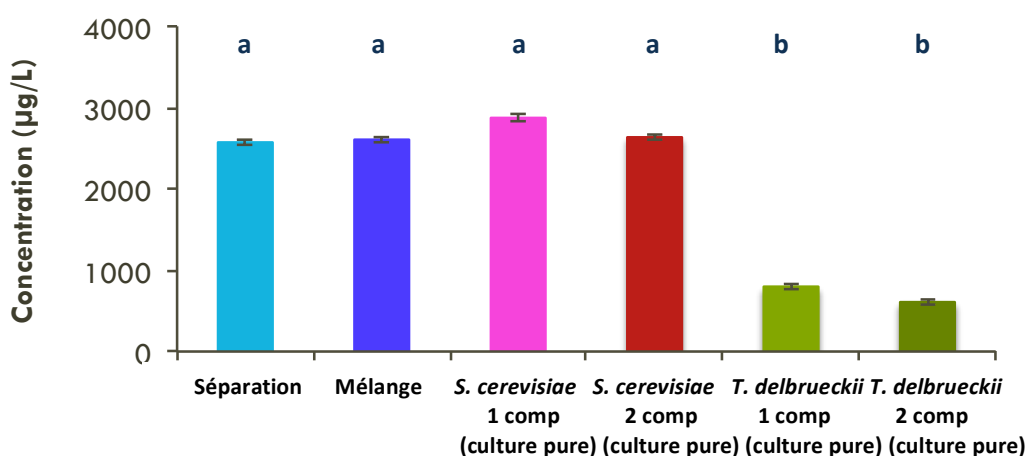
Séparation : les 2 espèces sont inoculées dans un seul compartiment du bioréacteur (culture mixte), Mélange : les 2 espèces sont inoculées dans les 2 compartiments du bioréacteur (culture mixte). Sc 1 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Sc 2 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans les deux compartiments du bioréacteur (culture pure). Td 1 comp : *T. delbrueckii* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Td 2 comp : *T. delbrueckii* est inoculée dans les deux compartiments du bioréacteur (culture pure).

*T. delbrueckii* : cultures pures. Pour cette espèce, en culture pure, les concentrations en 4MSP étaient similaires que *T. delbrueckii* soit inoculée dans 1 seul ou dans les 2 compartiments du bioréacteur. La valeur moyenne des deux compartiments est représentée ici.

### 2.3.2 Esters

Le dosage des esters a été effectuée par HS-SPME couplée à la GC-MS. 32 esters ont pu être analysés grâce à cette méthode. Parmi eux, certains sont connus pour impacter l'arôme fruité des vins: le propanoate d'éthyle (fraise), l'isobutanoate d'éthyle (fraise, kiwi), l'acétate de propyle (poire), l'acétate d'isobutyle (banane), le butyrate d'éthyle (kiwi, fraise), le 2-méthylbutyrate d'éthyle (kiwi), l'isovalerate d'éthyle (fruité), l'acétate d'isoamyle (banane), l'hexanoate d'éthyle (pomme, ananas), le butyrate d'isoamyle (banane, fraise, ananas), l'acétate d'hexyle (poire), l'octanoate d'éthyle (pomme), le décanoate d'éthyle (fruité), l'octanoate d'isoamyle (poire), le méthyl-trans-geranate (poire), le dihydrocinnamate d'éthyle (fruité, ananas et amande), le dodecanoate d'éthyle (fruité) et l'acétate de phényléthyle (fruité) (Antalick et al., 2010). Nous nous sommes donc intéressés à ces composés.

Ces résultats obtenus sont en accord avec les travaux précédents montrant que *T. delbrueckii* produit de plus faibles quantités d'esters que *S. cerevisiae* (Hernandez-Orte et al., 2008; Plata et al., 2003; Renault et al., 2009; Viana et al., 2008) (figure 19).



**Figure 19: Concentration totale en esters impliqués dans la note fruitée des cultures pures et mixtes**

Les valeurs moyennes des 3 répétitions sont représentées, les barres d'erreur représentent les écart-types.

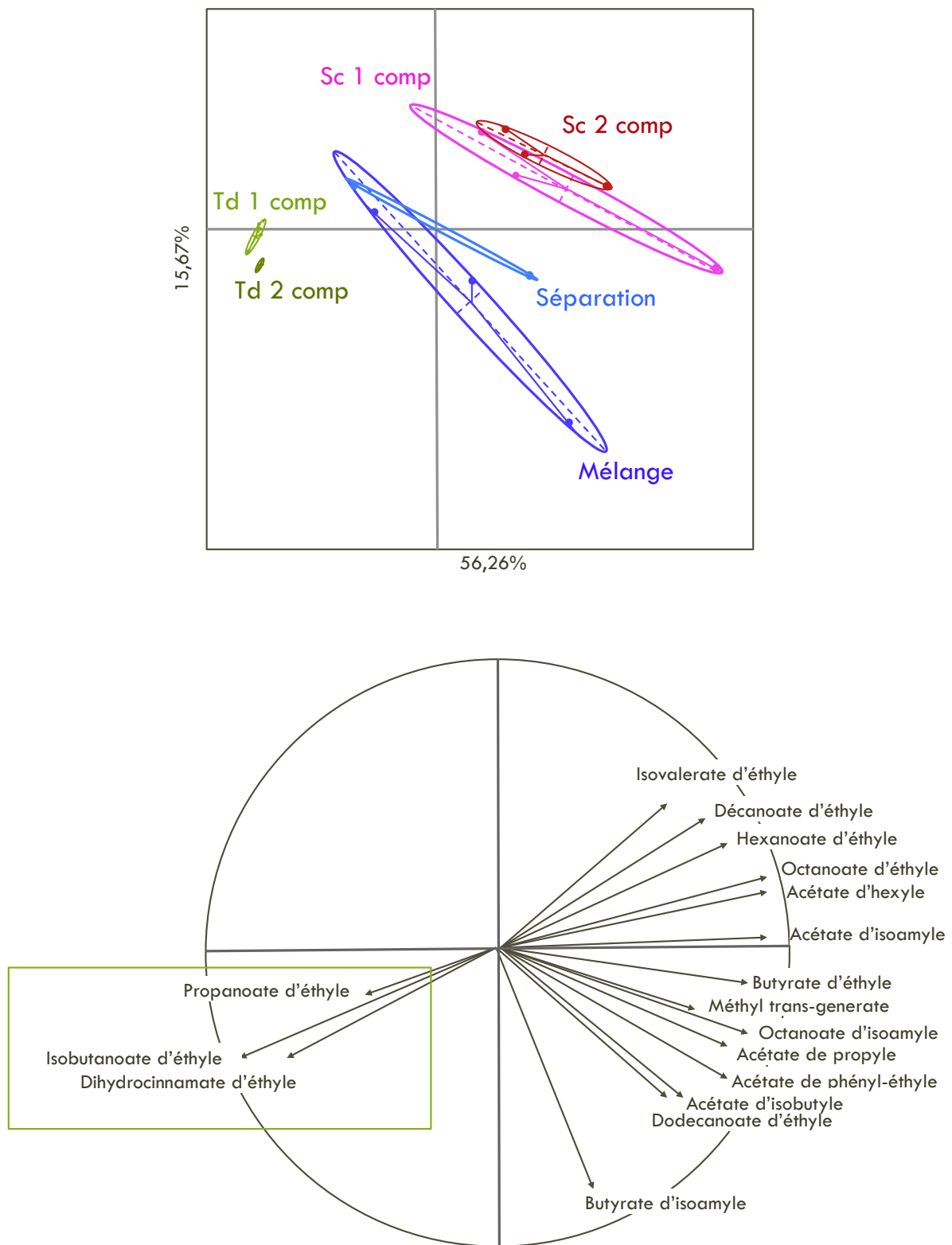
Séparation : les 2 espèces sont inoculées dans un seul compartiment du bioréacteur (culture mixte), Mélange : les 2 espèces sont inoculées dans les 2 compartiments du bioréacteur (culture mixte). Sc 1 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Sc 2 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans les deux compartiments du bioréacteur (culture pure). Td 1 comp : *T. delbrueckii* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Td 2 comp : *T. delbrueckii* est inoculée dans les deux compartiments du bioréacteur (culture pure).

Une analyse en composante principale a été effectuée afin de déterminer quel impact ont les différentes cultures sur la composition en esters impliqués dans la note fruitée (figure 20). Les deux premiers axes permettent d'expliquer 72% de la variation totale des esters. Nous pouvons constater que la composition en esters est caractéristique du type de culture. En effet, les cultures pures de *S. cerevisiae* (Sc 1 comp et Sc 2 comp) d'une part et de *T. delbrueckii* (Td 1 comp et Td 2 comp) d'autre part ont des compositions similaires. Les cultures mixtes ont des compositions intermédiaires, sans toutefois être identiques, montrant ainsi que les deux espèces sont impliquées au niveau de l'impact aromatique. Les fermentations effectuées avec *T. delbrueckii* se caractérisent par des teneurs plus élevées en dihydrocinnamate d'éthyle, isobutanoate d'éthyle et propanoate d'éthyle contrairement à *S. cerevisiae*, où les vins contiennent davantage de décanoate d'éthyle, d'hexanoate d'éthyle, d'octanoate d'éthyle d'acétate d'hexyle et d'acétate d'isoamyle (tableau 7).

**Tableau 7: Différences dans la composition en esters impliqués dans la note fruitée**

Les concentrations en esters sont données en µg/L

	Mélange	Séparation	<i>S. cerevisiae</i> 1 compartiment	<i>S. cerevisiae</i> 2 compartiments	<i>T. delbrueckii</i> 1 compartiment	<i>T. delbrueckii</i> 2 compartiments
Acétate d'isoamyle	1246,61 <sup>ab</sup> ± 79,51	1344,82 <sup>a</sup> ± 11,23	1273,52 <sup>ab</sup> ± 134,7	1156,10 <sup>a</sup> ± 18,81	1,57 <sup>c</sup> ± 0,07	5,08 <sup>bc</sup> ± 2,33
Acétate d'hexyle	52,65 <sup>bc</sup> ± 5,05	62,65 <sup>ab</sup> ± 5,90	58,69 <sup>ab</sup> ± 4,94	66,85 <sup>a</sup> ± 2,70	0,22 <sup>d</sup> ± 0,01	2,31 <sup>d</sup> ± 0,74
Acétate de phényl-éthyle	303,50 <sup>b</sup> ± 54,09	297,50 <sup>b</sup> ± 72,89	413,41 <sup>a</sup> ± 46,95	254,88 <sup>b</sup> ± 65,59	3,10 <sup>c</sup> ± 1,78	1,24 <sup>c</sup> ± 0,68
Acétate d'isobutyle	48,87 <sup>a</sup> ± 5,00	45,60 <sup>a</sup> ± 1,68	40,45 <sup>a</sup> ± 6,83	31,97 <sup>ab</sup> ± 7,06	26,86 <sup>b</sup> ± 0,56	18,95 <sup>b</sup> ± 2,94
Propanoate d'éthyle	173,41 <sup>a</sup> ± 53,30	199,19 <sup>a</sup> ± 3,69	60,52 <sup>b</sup> ± 5,75	56,52 <sup>b</sup> ± 1,34	134,55 <sup>a</sup> ± 41,36	108,77 <sup>a</sup> ± 11,39
Isobutanoate d'éthyle	48,35 <sup>bc</sup> ± 3,98	51,35 <sup>bc</sup> ± 11,42	8,94 <sup>c</sup> ± 2,58	11,93 <sup>c</sup> ± 1,83	134,55 <sup>a</sup> ± 1,21	82,19 <sup>ab</sup> ± 14,02
Hexanoate d'éthyle	215,87 <sup>a</sup> ± 60,48	243,31 <sup>a</sup> ± 26,07	237,07 <sup>a</sup> ± 101,5	330,72 <sup>a</sup> ± 40,23	50,67 <sup>b</sup> ± 11,04	55,02 <sup>b</sup> ± 6,93
Octanoate d'éthyle	119,86 <sup>b</sup> ± 0,61	165,87 <sup>b</sup> ± 26,93	232,09 <sup>a</sup> ± 23,83	230,35 <sup>a</sup> ± 0,35	4,01 <sup>c</sup> ± 0,37	6,65 <sup>c</sup> ± 5,29
Décanoate d'éthyle	16,95 <sup>b</sup> ± 1,35	17,42 <sup>bc</sup> ± 5,06	42,38 <sup>a</sup> ± 6,36	48,94 <sup>a</sup> ± 0,34	24,17 <sup>d</sup> ± 3,30	7,41 <sup>d</sup> ± 1,43
Dihydrocinnamate d'éthyle	2,55 <sup>c</sup> ± 0,89	3,95 <sup>b</sup> ± 0,87	0,60 <sup>e</sup> ± 0,20	1,46 <sup>d</sup> ± 0,25	13,60 <sup>a</sup> ± 9,62	9,99 <sup>a</sup> ± 0,65



**Figure 20: Analyse en composante principale de la composition en esters impactant la note fruitée en fonction des cultures pures et mixtes**

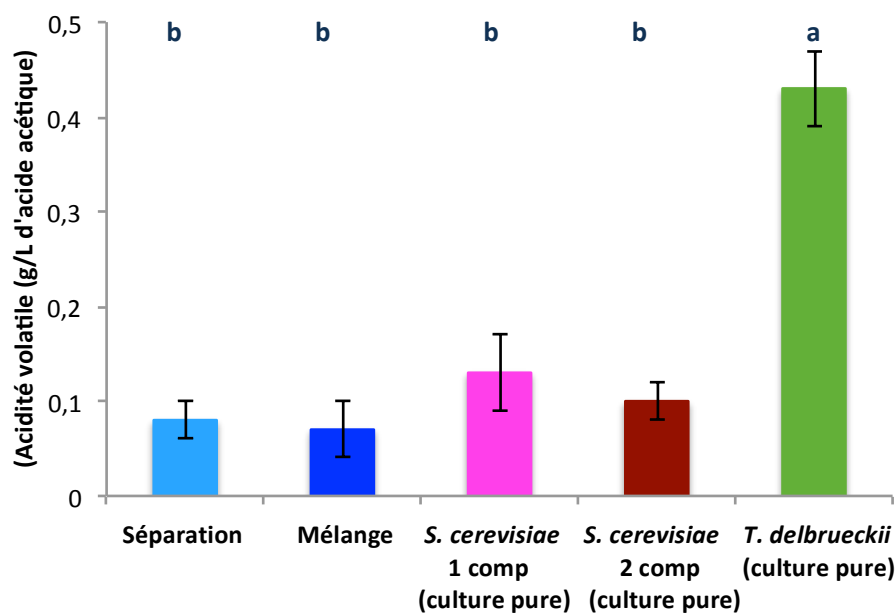
Séparation : les 2 espèces sont inoculées dans un seul compartiment du bioréacteur (culture mixte), Mélange : les 2 espèces sont inoculées dans les 2 compartiments du bioréacteur (culture mixte). Sc 1 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Sc 2 comp : *S. cerevisiae* est inoculée dans les deux compartiments du bioréacteur (culture pure). Td 1 comp : *T. delbrueckii* est inoculée dans un seul compartiment du bioréacteur (culture pure), Td 2 comp : *T. delbrueckii* est inoculée dans les deux compartiments du bioréacteur (culture pure).

Pour l'ensemble des esters étudiés, les concentrations retrouvées dans les cultures mixtes « séparation » et « mélange » sont similaires. En cultures mixtes, une forte augmentation du propanoate d'éthyle est observée par rapport aux cultures pures de *S. cerevisiae*, la concentration obtenue est alors similaire à celle des cultures pures de *T. delbrueckii*. Les concentrations en dihydrocinnamate d'éthyle et isobutanoate d'éthyle obtenues en cultures mixtes sont supérieures à celles des cultures pures de *S. cerevisiae* mais reste inférieure à celles des cultures pures de *T. delbrueckii*. L'acétate d'isoamyle, l'hexanoate d'éthyle, l'acétate d'hexyle et l'acétate d'isobutyle sont retrouvés en cultures mixtes à des concentrations similaires à celles de cultures pures de *S. cerevisiae*. Il en est de même pour l'acétate de phényléthyle lorsque les deux espèces sont cultivées en mélange. En revanche, lorsque les deux espèces sont cultivées séparément, ce composé est présent en plus faible quantité que lors des cultures pures de *S. cerevisiae*. De la même façon, l'octanoate d'éthyle et le décanoate d'éthyle sont retrouvés en plus faible quantité dans les cultures mixtes du fait de la présence de *T. delbrueckii* qui ne produit que de faibles quantités de ces deux esters, traduisant une interaction négative entre les deux espèces (Renault et al., 2009).

En 2015, Renault et al. ont montré que lors de co-inoculations avec *S. cerevisiae* X5, trois esters contribuant à la note fruitée des vins sont considérés comme des marqueurs de l'activité de *T. delbrueckii* Alpha : propanoate d'éthyle, isobutanoate d'éthyle et dihydrocinnamate d'éthyle. Une forte augmentation de ces trois esters a également été observée en cultures mixtes par rapport aux cultures pures de *S. cerevisiae* dans le cadre de notre étude. Enfin, les concentrations en esters étant similaires entre les modalités mélangées et séparées, la composition en esters ne semble pas liée à la population de *S. cerevisiae*, plus faible avec séparation qu'en mélange.

### 2.3.3 Production d'acidité volatile

L'acidité volatile est constituée à 95% d'acide acétique et à 5% d'autres acides organiques qui s'accumulent au cours du processus de vinification. En France, l'acidité volatile est officiellement exprimée en g/L d' $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Dans les vins, au delà d'environ 0,6 g/L, l'acide acétique a un effet néfaste sur la qualité organoleptique (Lambrechts and Pretorius, 2000). Les résultats d'acidité volatile seront exprimés ici en g/L d'acide acétique pour évaluer la production d'acide acétique des deux espèces (figure 21). La teneur en acidité volatile des vins est réglementée et ne doit pas dépasser 0,9 g/L d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  (soit 1,08 g/L d'acide acétique) dans les vins blancs secs



**Figure 21: Production d'acidité volatile en cultures pures et mixtes**

Les valeurs moyennes des 3 répétitions sont représentées, les barres d'erreur représentent les écart-types.

Séparation : les 2 espèces sont inoculées dans un seul compartiment du bioréacteur (culture mixte), Mélange: les 2 espèces sont inoculées dans les 2 compartiments du bioréacteur (culture mixte). *S. cerevisiae* culture pure : pour cette espèce, en culture pure, les concentrations en acidité volatile étaient similaires que *S. cerevisiae* soit inoculée dans 1 seul ou dans les 2 compartiments du bioréacteur. La valeur moyenne des deux compartiments est représentée ici. *T. delbrueckii* culture pure : pour cette espèce, en culture pure, les concentrations en acidité volatile étaient similaires que *T. delbrueckii* soit inoculée dans 1 seul ou dans les 2 compartiments du bioréacteur. La valeur moyenne des deux compartiments est représentée ici.

En culture pure, *T. delbrueckii* produit une quantité plus importante d'acide acétique que *S. cerevisiae*. Ce résultat est surprenant car cette souche de *T. delbrueckii* a été sélectionnée pour sa faible production d'acidité volatile (Renault, 2010). Ce phénomène a déjà été observé au laboratoire avec la même souche et est probablement dû à l'agitation continue et à la forme du fermenteur qui permet de maintenir *T. delbrueckii* viable plus longtemps, entraînant ainsi une accumulation de l'acide acétique.

Les concentrations en acide acétique des deux types de cultures mixtes sont similaires et comparables à celle obtenue lorsque la fermentation est effectuée avec *S. cerevisiae* en culture pure.

### 3 Discussion

Les levures non-*Saccharomyces* (principalement les genres *Hanseniaspora*, *Candida*) sont généralement retrouvées en forte proportion dans le moût. Elles initient la fermentation alcoolique mais sont assez rapidement « supplantées » par l'espèce *S.cerevisiae*, qui domine de la mi-fermentation jusqu'au stade final du processus. C'est donc logiquement qu'en s'appuyant sur les premières études écologiques, que des cultures pures de *S.cerevisiae* ont été isolées et développées comme starters ou levains industriels (Papin, 1989; Reed and Nagodawithana, 1988).

Les industriels sont actuellement aussi intéressés par les autres espèces de la flore du moût. En effet, d'un côté la généralisation de l'utilisation de *S.cerevisiae* en vinification est, pour certains, à l'origine d'une uniformisation organoleptique des vins et, d'un autre côté, la compétition internationale sur le marché du vin pousse les industriels à répondre aux attentes de certains consommateurs, toujours à la recherche d'un produit innovant avec plus de typicité. C'est dans ce contexte que, depuis une dizaine d'années, plusieurs levains non-*Saccharomyces*, à associer à *S. cerevisiae*, sont apparus sur le marché. L'espèce *T. delbrueckii* est commercialisée par les trois sociétés présentes sur le marché européen. Retrouvée naturellement dans les moûts en faibles proportions, *T. delbrueckii* a un impact positif sur la qualité organoleptique des vins du fait de sa faible production de composés indésirables (acétoïne, acide acétique, acétate d'éthyle... ) (Cabrera et al., 1988; Ciani and Maccarelli, 1997; Ciani and Picciotti, 1995; Ciani et al., 2006; Herraiz et al., 1990; Martinez et al., 1990; Peynaud, 1956; Plata et al., 2003; Shinohara et al., 2000). Elle est particulièrement intéressante dans les conditions de vinification en moûts hyper-osmotiques, c'est à dire très riches en sucres (supérieur à 350 g/L, type vins liquoreux), du fait de sa faible production d'acidité volatile (Bely et al., 2008; Ciani et al., 2006). Elle est également capable de libérer de nombreux composés aromatiques tels que les nor-isoprénoides, terpénols, lactones, thiols volatils (Azzolini et al., 2012; Charoenchai et al., 1997; Comitini et al., 2011; Hernandez-Orte et al., 2008).

Néanmoins, du fait de la complexité et la méconnaissance des phénomènes d'interactions entre *T. delbrueckii* et *S.cerevisiae*, la qualité finale des vins, lorsque ces deux espèces sont utilisées comme starters industriels, est difficile à prédire. L'étude des mécanismes d'interactions entre ces deux espèces est donc nécessaire afin d'exploiter le mieux possible leurs métabolismes.

La présence, ou l'absence, de contact physique (interaction directe ou indirecte) entre les populations est un des critères généraux pour classer les interactions entre microorganismes (Fredrickson, 1977; Strehaiano et al., 2008). En vinification, les principales interactions décrites sont indirectes de types amensalisme ou compétitif (Fleet, 2003; Pommier et al., 2005). Néanmoins un autre type d'interaction comme le commensalisme a été décrit par (Cheraiti et al., 2005).

Les mécanismes d'interactions, souvent évoqués en œnologie pour expliquer l'inhibition des levures non-*Saccharomyces* par *S.cerevisiae*, sont : l'inhibition par la production d'éthanol, d'acides gras à courtes chaînes, de toxines « killer » et d'autres composés toxiques, la limitation nutritionnelle ou compétition de substrats. Plusieurs types d'interactions entre *S.cerevisiae* et *T.delbrueckii* ont été décrits récemment : compétition pour les nutriments (Ciani et al., 2006), pour l'oxygène (Holm et al., 2001) ou l'inhibition par libération de peptides (Albergaria et al., 2010). En 2003, (Nissen and Arneborg 2003; Nissen et al. 2003, Renault 2013) ont décrit un mécanisme de type « cell-cell contact » qui serait à l'origine de l'inhibition de *T.delbrueckii* par l'espèce *S.cerevisiae*.

L'ensemble des fermentations de cette partie a été réalisé en fermenteur double compartiment, développé récemment au laboratoire (Renault et al., 2013). Les deux compartiments sont séparés par une membrane centrale permettant le passage du milieu mais pas des microorganismes, l'homogénéisation rapide du milieu entre les deux compartiments étant assurée par un système de pompe péristaltique. La régulation de la température et le suivi de la cinétique de fermentation se font de manière automatisée et des prélèvements réguliers ont permis d'effectuer le suivi des populations. Deux types de cultures mixtes ont été réalisés : séparées (chaque espèce est inoculée dans un seul compartiment) ou en mélange (les deux espèces sont inoculées dans les deux compartiments). Des cultures pures ont également été effectuées pour chaque espèce, en inoculant les deux ou un seul compartiment du bioréacteur. En effet, dans un premier temps, nous avons souhaité déterminer si l'augmentation de la densité cellulaire due à l'inoculation d'un seul compartiment (cas des cultures séparées) n'introduisait pas un biais dans les résultats en modifiant le comportement de nos deux espèces. Le rapport d'inoculation *S. cerevisiae* X5/*T. delbrueckii* Alpha choisi était de 1 :20 soit  $5.10^5$  cellules viables/mL (du volume final du fermenteur) pour X5 et  $1.10^7$  cellules viables/mL pour Alpha. Ces concentrations ont été retenues car elles permettent à la fois une croissance importante de *T. delbrueckii* et une fermentation complète lorsque les deux espèces sont cultivées en mélange.

- **L'effet densité observé chez *S. cerevisiae* est moins important que l'effet lié aux interactions**

Nous avons dans un premier temps montré un effet densité seulement lors des cultures pures chez *S. cerevisiae* pour les paramètres suivants : vitesse maximale de fermentation concentrations en dihydrocinnamate d'éthyle et acétate de phényl-éthyle et production de 4MSP. Cependant cet effet densité est moins important que l'effet lié aux interactions entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*.



- **Mise en évidence d'interactions par cell-cell contact/proximité physique**

L'analyse des cinétiques de croissance a permis de mettre en évidence que les croissances des deux espèces en cultures mixtes, avec ou sans séparation, sont modifiées par rapport aux cultures pures. La comparaison de ces deux types de cultures mixtes entre elles, et des cultures mixtes par rapport aux cultures pures de chaque espèce a permis de mieux comprendre les phénomènes d'interactions mis en jeu entre *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. L'hypothèse d'interactions impliquant uniquement la production de composés toxiques par l'une ou l'autre des espèces, semble peu probable, les deux espèces n'ayant pas un comportement similaire avec ou sans séparation (le milieu étant identique dans les 2 compartiments). Tout d'abord, nous avons pu mettre en évidence que la mortalité de *T. delbrueckii* est plus importante uniquement lorsque les deux espèces sont cultivées en mélange. Ces résultats confirment le phénomène de mort précoce de *T. delbrueckii* lorsqu'elle est cultivée en mélange avec *S. cerevisiae*, observé avec des couples de souches différents lors d'études précédentes et suggèrent l'existence d'interactions de type cell-cell contact (Ciani and Comitini, 2015; Fleet, 2003; Nissen and Arneborg, 2003; Nissen et al., 2003; Renault et al., 2013). En effet, la séparation, qui empêche la proximité cellulaire, modifie le comportement des deux espèces. Si à ce jour les molécules impliquées et leurs effets ne sont pas encore élucidés, deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. Soit ces interactions impliquent un contact physique direct entre les cellules et des molécules types récepteurs/ligands au niveau membranaire, soit *S. cerevisiae* produit des molécules inhibitrices qui créent un gradient, avec une concentration à proximité de *S. cerevisiae* assez élevée pour être létale pour *T. delbrueckii*. Les récents travaux de Kemsawasd et al. (2015) semblent privilégier cette deuxième hypothèse. En effet, ces auteurs ont étudié les interactions entre *L. thermotolerans* et *S. cerevisiae*, en milieu de laboratoire, en culture mixte séparée et mélangée. Dans le cas de la modalité séparée, *L. thermotolerans* était cultivée à l'intérieur d'un boudin de dialyse en cellulose ayant un cut-off de 1000 kDa ou 3,5-5 kDa. Une diminution de la mortalité de *L. thermotolerans* a été observée lors des 2 cultures séparées par rapport au mélange (pour les deux cut-off), confirmant l'existence d'interactions par cell-cell contact. Cependant, une diminution plus importante de la mortalité était observée pour le cut-off 3,5-5 kDa. Un dosage des peptides antimicrobiens sécrétés par *S. cerevisiae* et décrits par Albergaria et al., (2010) a mis en évidence que les peptides sont répartis de façon homogène à l'intérieur et à l'extérieur du boudin de dialyse pour le cut-off à 1000 kDa. En revanche, une concentration moins importante de peptides antimicrobiens était retrouvée à l'intérieur du boudin dont le cut-off était à 3,5-5 kDa. Le cell-cell contact et les peptides antimicrobiens jouent donc un rôle dans l'augmentation de la mortalité observée chez *L. thermotolerans*. Une activité fungistatique avait été décrite chez *T. delbrueckii* en présence de ces

peptides (Albergaria et al., 2010). Néanmoins, l'ensemble des essais réalisés jusqu'à présent n'a pas été effectué en conditions oenologiques, l'implication exacte de ces peptides, lors des interactions entre *S. cerevisiae* et les non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique, n'est pas encore déterminée.

De plus, *S. cerevisiae* atteint une population maximale plus faible lorsque les deux espèces sont cultivées séparément par rapport aux cultures en mélange et aux cultures pures. Ce phénomène ne semble pas être spécifique aux interactions *S. cerevisiae*/*T. delbrueckii*. Récemment, une étude réalisée avec le couple *S. cerevisiae*/*L. thermotolerans* a montré qu'en culture mixte avec séparation, les deux espèces sont affectées par rapport aux cultures pures et notamment *S. cerevisiae* atteint une population maximale plus faible (Beaufort et al., 2015). Ce phénomène ne semble pas être expliqué par un mécanisme de type quorum-sensing. En effet, le quorum-sensing peut être défini comme la régulation de l'expression de certains gènes en réponse à des fluctuations de densité de population (Miller and Bassler, 2001). Les cellules sécrètent des molécules signal qui, lorsqu'elles atteignent une concentration seuil (donc lorsqu'une certaine densité cellulaire est obtenue), déclenchent l'expression d'un groupe de gènes, soit au sein de son propre métabolisme, soit chez les autres espèces présentes dans le milieu. Dans notre étude, les populations maximales de *S. cerevisiae* obtenues dans les deux types de cultures pures (inoculation dans 1 seul ou dans les 2 compartiments du bioréacteur) étaient similaires pour le volume total du réacteur. La densité de cellules de *S. cerevisiae*, plus importante dans la culture pure inoculée dans un seul compartiment, n'a pas entraîné de régulation négative de la population maximale de cette espèce. Dans le cas de la modalité mixte séparée, *S. cerevisiae* a atteint une population maximale plus faible qu'en mélange et que pour la culture pure lorsqu'elle est inoculée dans un seul compartiment (Sc 1 comp). La densité cellulaire obtenue dans le cas de la modalité « séparation » est donc moins importante que dans le cas de la culture pure « Sc 1 comp ». Cette diminution de la capacité biotique ne semble donc pas liée à un mécanisme de quorum-sensing.

Ce phénomène ne semble pas non plus lié à l'action de métabolites de *T. delbrueckii* : aucune différence n'a été observée entre les cultures en mélange et les cultures pures de *S. cerevisiae* concernant la croissance de cette dernière. Pour expliquer cette diminution de la population maximale de *S. cerevisiae* en cultures mixtes séparées, nous pouvons supposer que la séparation a permis soit à *T. delbrueckii* de démarrer plus rapidement sa croissance et ainsi consommer plus rapidement certains nutriments présents dans le moût (vitamines, azote), limitant ainsi la croissance de *S. cerevisiae* soit la séparation a retardé le départ de la croissance de *S. cerevisiae* ce qui a été favorable pour l'autre espèce. La séparation a été bénéfique pour *T.*

*delbrueckii* en lui permettant de maintenir un taux de viabilité élevé, similaire à celui observé en cultures pures.

- **Comparaison des cinétiques de fermentation alcoolique cultures mixtes vs. cultures pures**

Dans ces essais, une Vmax plus faible, par rapport à la culture pure de *S. cerevisiae*, a été obtenue lorsque les espèces sont cultivées en mélange. Ce résultat diffère de ceux de Renault et al. (2013), où cette vitesse était plus faible dans les deux types de cultures mixtes, en mélange et avec séparation. Néanmoins, leurs conditions expérimentales différaient des nôtres : le couple de souches utilisé n'était pas identique à celui de notre étude, le milieu synthétique utilisé par ces auteurs n'avait pas permis à la souche de *T. delbrueckii* utilisée de se développer, les cultures pures de chacune des deux espèces n'avaient pas été effectuées en fermenteur double-compartiment comme les cultures mixtes et enfin l'impact de l'effet densité (inoculation dans un ou deux compartiments) n'avait pas été étudié. Ce dernier point peut expliquer qu'une diminution du Vmax ait été observée dans les deux cas lors de ces précédents essais. En effet, comme présenté sur la figure 14B, la valeur du Vmax obtenue en culture pour *S. cerevisiae* varie en fonction de l'inoculation dans un ou deux compartiments du fermenteur.

- **Impact des cultures mixtes sur la libération des thiols volatils**

L'impact de ces molécules sur l'arôme des vins de plusieurs cépages, notamment du Sauvignon blanc, a été rapporté par de nombreux auteurs (Coetzee and du Toit, 2012; Darriet et al., 1995; Tominaga et al., 1998). Parmi ces composés, la 4MSP (4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one ; descripteur buis, genêt) et le 3SH (3-sulfanylhéxan-1-ol ; descripteur pamplemousse, fruit de la passion) sont révélés par la levure à partir de précurseurs non volatils et inodores (Howell et al., 2004; Peyrot des Gachons et al., 2002; Tominaga et al., 1998). Du fait de leur faible seuil de perception (0,8 ng/L pour la 4MSP et 60 ng/L pour le 3SH), ils contribuent significativement au profil aromatique des vins. La 4MSP et le 3SH sont produits à partir des précurseurs glutathionylés et cystéinylés présents dans le moût grâce à l'action des  $\beta$ -lyases des levures (Coetzee and du Toit, 2012; Darriet et al., 1995; Fedrizzi et al., 2009; Peyrot des Gachons et al., 2002; Roland et al., 2011; Subileau et al., 2008).

Parmi les facteurs qui impactent la production des thiols, la levure joue un rôle majeur. Au sein de l'espèce *S. cerevisiae*, il existe une grande variabilité entre souches (Murat et al., 2001; Tominaga and Dubourdieu, 2006). Plus récemment, parmi les levures non-*Saccharomyces*, plusieurs

espèces ont été décrites comme ayant des aptitudes intéressantes (Anfang et al., 2009; Sadoudi et al., 2012), la plus productrice étant l'espèce *Pichia kluyveri* (commercialisée depuis 2011 par la société Hansen). L'espèce *T. delbrueckii* a également la capacité de révéler le 3SH mais très peu le 4MSP (Sadoudi et al., 2012; Zott et al., 2011).

Dans notre étude, la comparaison entre les modalités pures de *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* a permis de confirmer la faible capacité de la souche *T. delbrueckii* Alpha à révéler la 4MSP, par rapport *S. cerevisiae* Zymaflore X5 (souche à haut potentiel de révélation des thiols). Ces travaux confirment ceux obtenus par d'autres auteurs avec des souches différentes de *T. delbrueckii* (Sadoudi et al., 2012; Zott et al., 2011).

Les concentrations en 4MSP retrouvées dans les vins pour les deux types de cultures mixtes (séparée ou mélangée) sont similaires et par ailleurs elles sont très inférieures (environ 4 fois moins) à celles retrouvées dans les cultures pures de *S.cerevisiae*. Cette faible production, en cultures mixtes, a déjà été décrite par Renault et al., (soumis) et souligne qu'il existe bien un effet d'interaction entre les 2 espèces pour ce composé mais la nature de ces interactions reste à élucider. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées comme la compétition de substrat ou le relargage de produits réagissant avec la 4MSP.

La libération de 3SH était similaire dans les cultures pures, pour les deux espèces, lorsque l'inoculation a eu lieu dans un ou deux compartiments. La libération de 3SH est globalement plus importante dans les cultures pures *T. delbrueckii* par rapport aux cultures pures de *S. cerevisiae*. Cette dernière observation est en accord avec les résultats de Renault et al. (soumis) avec le même couple de souches.

La concentration en 3SH des vins lorsque les deux espèces sont mélangées ne diffère pas des cultures pures de *S. cerevisiae* ce qui est en accord avec Sadoudi et al., (2012) et Renault et al., (soumis). Par contre, la séparation physique a permis une augmentation de la libération de 3SH de 61% par rapport à la culture pure de *S.cerevisiae* lorsqu'elle est inoculée dans un compartiment. Récemment, les travaux de Renault et al., (soumis) ont permis de démontrer que contrairement à la souche *S. cerevisiae* X5, qui est capable de métaboliser les 2 formes de précurseurs, glutathionylés et cystéinylés, présents dans le moût, *T. delbrueckii* Alpha est capable de métaboliser seulement la forme glutathionylée. De plus, sa présence en cultures mixtes entraîne systématiquement une dégradation plus importante de ce précurseur par rapport à la culture pure de *S.cerevisiae* X5. Cela se traduit par une augmentation du relargage du précurseur cystéinylé dans le milieu extracellulaire (issu de la dégradation de la forme glutathionylée), expliquant probablement l'augmentation de la libération de 3SH en fin de fermentation.

Dans nos conditions expérimentales, les populations maximales de *T. delbrueckii* étaient identiques dans les 2 cultures mixtes (séparée  $1,1 \cdot 10^8$  cellules viables /mL et mélangée  $9,9 \cdot 10^7$  cellules viables /mL), par contre celle de *S.cerevisiae* était deux fois moins élevée en culture séparée ( $5,8 \cdot 10^7$  cellules viables/mL) par rapport au mélange ( $1,1 \cdot 10^8$  cellules viables/mL). Aussi, le rapport des populations maximales *T.delbrueckii* / *S.cerevisiae* est supérieur dans la culture séparée (1,89) par rapport à la culture où les espèces sont en contact (0,9). De plus, la séparation avait permis à *T. delbrueckii* de maintenir une population viable élevée plus longtemps qu'en mélange (pourcentage de mortalité moins important avec séparation). Ces différences nous laissent penser qu'une quantité plus importante de précurseur glutathionylé a été transformée par *T. delbrueckii* en précurseur cystéinylé. Ce dernier pourrait par la suite être transformé en 3SH par *S. cerevisiae*.

- **Impact des cultures mixtes sur la composition en esters**

L'espèce *T. delbrueckii* a souvent été décrite comme peu productrice de composés volatils majeurs (alcools supérieurs, esters). Seul le phenyl-2-éthanol semble être produit à des concentrations supérieures à son seuil de perception (Hernandez-Orte et al., 2008; Plata et al., 2003; Renault et al., 2009; Viana et al., 2008).

Par contre, lors de son utilisation en moût naturel en co-inoculation avec une souche de *S.cerevisiae* et en comparaison avec la culture pure de *S.cerevisiae*, la complexité aromatique et la note fruitée étaient souvent augmentées, indépendamment du moût et de la souche de *S.cerevisiae* utilisés. Cet impact sur la qualité du vin lié à l'utilisation mixte de ces deux espèces a fait l'objet de travaux récents au laboratoire (Renault et al. 2015). Le dosage des esters fruités selon la méthode de Antalick et al., (2010) a permis de mettre en évidence que trois esters retrouvés en faibles quantités et connus pour impacter l'arôme fruité des vins (Escudero et al. 2007; Pineau et al. 2009), ont été systématiquement retrouvés en quantités plus importantes lors de l'utilisation de la souche *T.delbrueckii* Alpha (en culture pure ou mixte avec *S. cerevisiae*) en comparaison à l'espèce *S.cerevisiae*. Il s'agit de l'isobutanoate d'éthyle (descripteurs : fraise, kiwi), le propanoate d'éthyle (fraise) et le dihydrocinnamate d'éthyle (descripteurs : fruité, ananas et amande).

Le dosage de 18 esters, impliqués dans le caractère fruité, dans les vins issus de nos différentes modalités (cultures pures *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* 1 et 2 compartiments et cultures mixtes séparée ou mélangée) a permis de confirmer les résultats ci-dessus. En effet, dans nos conditions expérimentales les concentrations de ces trois esters (isobutanoate d'éthyle, propanoate d'éthyle et dihydrocinnamate d'éthyle) étaient systématiquement augmentées en présence de *T. delbrueckii*, en culture pure (1 ou 2 compartiments) ou en association avec *S. cerevisiae* (mélange

ou séparation), soulignant une interaction positive entre les deux espèces par rapport aux cultures pures de *S. cerevisiae*.

En revanche, l'octanoate d'éthyle et le décanoate d'éthyle sont retrouvés en plus faible quantité dans les cultures mixtes (mélangées ou séparées) par rapport aux cultures pures de *S. cerevisiae*, traduisant une interaction négative entre les deux espèces.

Nos résultats confirment également que *T. delbrueckii* produit peu d'esters « majeurs » (produits en grande quantité par *S. cerevisiae*) tels que l'acétate d'isoamyle, l'acétate de phényl-éthyle, l'hexanoate d'éthyle et l'octanoate d'éthyle. En effet, les concentrations de ces esters dans les cultures pures de *T. delbrueckii* (1 ou 2 compartiments) étaient très inférieures (maximum 4 µg/L) à celles des cultures pures (1 ou 2 compartiments) de *S. cerevisiae* (concentrations comprises entre 232 à 1273 µg/L selon les esters et les modalités). L'acétate d'isoamyle, l'hexanoate d'éthyle, l'acétate d'hexyle, l'acétate d'isobutyle et l'acétate de phényl-éthyle, produits en quantités importantes par *S. cerevisiae*, sont retrouvés en cultures mixtes à des concentrations similaires à celles des cultures pures de *S. cerevisiae*, suggérant qu'il n'existe pas d'interactions entre les deux espèces pour ces composés.

Contrairement à ce qui a été observé lors de la libération du 3SH, la séparation physique des deux espèces n'a pas entraîné de variations de la concentration des esters impliqués dans le caractère fruité des vins. Le rapport de population maximale *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*, plus élevé dans la culture mixte séparée, n'a pas entraîné d'augmentation de la concentration en esters pour cette modalité.

Afin de mieux comprendre ces phénomènes d'interactions, une analyse protéomique était prévue dans ce travail. Pour chaque modalité, un prélèvement a été effectué à mi-croissance pour chaque espèce, afin que les deux espèces soient dans le même état physiologique et pas en situation de carence azotée. Les protéines ont été extraites à partir des culots cellulaires et analysées par LC/MS-MS. L'analyse des échantillons et des données sont en cours et nous permettront de déterminer si certaines familles protéiques (protéines de stress, impliquées dans la mort cellulaire...), ou voies métaboliques sont affectées différemment par la séparation.

## Partie 2 : Incidence de facteurs de l'environnement sur le développement des levures non-*Saccharomyces*

---

# Matériels et méthodes

## 1 Matériel biologique

Dans cette partie, sept souches de levures différentes ont été utilisées, correspondant à cinq espèces de non-*Saccharomyces* et deux souches de l'espèce *S. cerevisiae*.

Les deux souches de *S. cerevisiae* ont été construites à partir de la souche commerciale X5 :

- Une souche à phase de latence de fermentation courte fluorescente, Sc PLC -YFP
- Une souche à phase de latence de fermentation longue fluorescente, Sc PLL-YFP

La construction de souches fluorescentes a permis de quantifier *S. cerevisiae* dans le mélange d'espèces. La souche commerciale X5 possède une phase de latence courte et n'est pas fluorescente.

Les informations concernant les différentes souches sont résumées dans le tableau 8.

**Tableau 8: Souches utilisées**

Espèce	Souche	Dénomination utilisée	Collection	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Alpha	Td	Laffort, Bordeaux, France	Souche industrielle
<i>Metschnikowia</i> spp.	CRBO L0563	Mets	Centre de Ressources Biologiques Oenologiques, Bordeaux, France	99% d'identité avec <i>M. andauensis</i>
<i>Candida zemplinina</i>	CRBO PE401	Cz		
<i>Pichia kluyverii</i>	CRBO Pk.31	Pk		
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CRBO L0666	Hu		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PLC/YFP+.48	Sc PLC-YFP	-	Même fond génétique que la souche commerciale X5 (Laffort) avec phase de latence de fermentation courte, fluorescente.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PLL/YFP+.14	Sc PLL-YFP	-	Même fond génétique que la souche commerciale X5 (Laffort) avec phase de latence de fermentation longue, fluorescente.



## 2 Construction des souches de *S. cerevisiae*

### 2.1 Stratégie

#### 2.1.1 Obtention de souches de *S. cerevisiae* fluorescentes

La souche commerciale X5 a été transformée avec une cassette d'ADN contenant les gènes *YFP* et *NAT*. Le gène *YFP* code une protéine de type GFP présentant un maximum d'émission aux alentours de 525 nm (DeLuna et al., 2010). Le gène *NAT* confère à la levure la résistance à la nourseothricine (Goldstein and McCusker, 1999) (figure 22). Cette cassette a été introduite à l'intérieur du gène *HO* de *Saccharomyces cerevisiae* qui code pour une endonucléase impliquée dans la détermination du signe sexuel. Il a été montré que la délétion de ce gène était neutre d'un point de vue métabolique. Son inactivation du fait de l'insertion de la cassette n'entraîne donc pas de perturbation métabolique. Les gènes *YFP* et *NAT* sont respectivement sous le contrôle des promoteurs forts, *TDH3* et *TEF* qui permettent leur expression constitutive chez la levure.

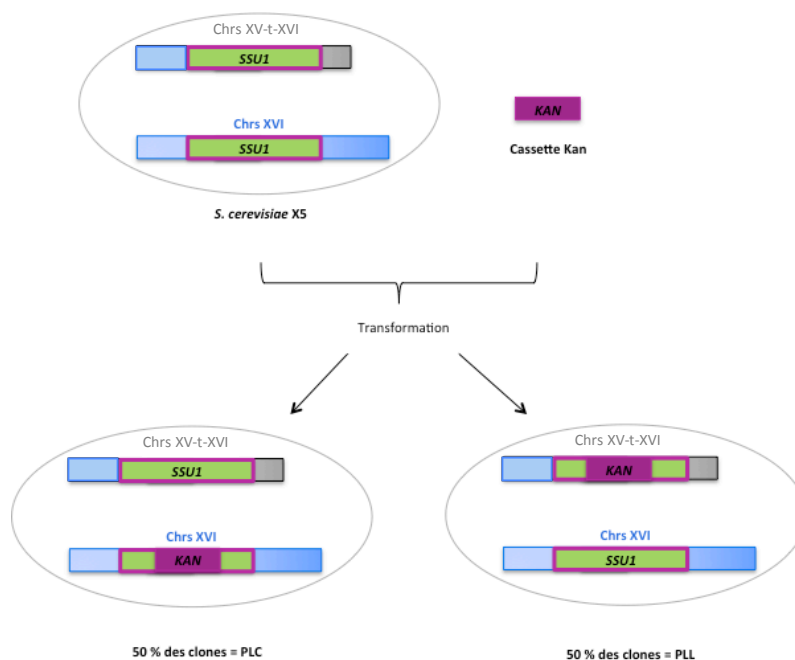


Figure 22: Cassette YFP inséré dans le gène *HO*

#### 2.1.2 Obtention d'une souche de *S. cerevisiae* à phase de latence longue

Des études précédentes ont permis de mettre en évidence une nouvelle translocation (XV-t-XVI) associée à la durée de la phase de latence (temps écoulé entre le moment de l'inoculation et le démarrage de la fermentation alcoolique) chez *S. cerevisiae*, impliquant le gène *SSU1*. Les souches possédant le gène *SSU1* sous contrôle du promoteur *ADH1* situé sur le chromosome XV-t-XVI possèdent une phase de latence courte (Zimmer 2013).

La souche commerciale X5 possède deux copies du gène *SSU1*, une sur le chromosome XV-t-XVI et une sur le chromosome XVI. Afin d'obtenir une souche à phase de latence longue, le gène *SSU1* a été inactivé par l'insertion d'une cassette contenant le gène *KAN* codant pour la résistance à la G418. A l'issue de la transformation, différents clones possédant la cassette *KAN* ont été obtenus (figure 23).



**Figure 23: Caractéristiques des clones de *S. cerevisiae* obtenus après transformation avec la cassette KAN**

Les souches de *S. cerevisiae* à phase de latence longue possèdent une pompe à sulfites permettant de relarguer le  $\text{SO}_2$  dans le milieu déficiente contrairement à la souche *S. cerevisiae* à phase de latence courte (Zimmer, 2013). Cette souche est alors capable d'incorporer le  $\text{SO}_2$  libre dans sa cellule mais pas de le faire ressortir. La conséquence directe de ce dysfonctionnement est une diminution de la concentration en  $\text{SO}_2$  libre dans le milieu, pouvant ainsi favoriser le développement de certaines espèces de levure sensibles à ce composé.

## 2.2 Extraction d'ADN

Une extraction d'ADN de deux souches de laboratoire de *S. cerevisiae* possédant au sein de leur génome les cassettes d'intérêt a été réalisée : la souche Y7092-YFP (DeLuna et al. 2008) pour la cassette YFP et la souche YO2160 pour la cassette KAN.

Les deux souches ont été préalablement cultivées sur milieu YPD solide (partie 1 matériels et méthodes chapitre 3.1). Puis, une anse de culot de cellule a été placée dans un tube de 1,5 mL et lysée en présence de 300  $\mu\text{L}$  de Nuclei Lysis Solution (Wizard Genomic DNA purification Kit, Promega) et 100  $\mu\text{L}$  de microbilles de verre (acid-washed, 425-600  $\mu\text{m}$ , Sigma) à l'aide d'un FastPrep24 (MP Biomedicals, Illkirch, France). Les cellules ont été broyées 45 secondes à 4m/s. Après centrifugation (2000 rpm, 2 min), le surnageant a été récupéré et 100  $\mu\text{L}$  de Protein Precipitation Solution (Wizard Genomic DNA purification Kit, Promega) ont été ajoutés. Les tubes ont été incubés 5 minutes dans la glace et centrifugés 3 minutes à 14 000 rpm. Les surnageants ont

été transférés dans un tube contenant 300 µL d'isopropanol. Après une nouvelle centrifugation, l'ADN a été repris dans 300 µL d'éthanol à 70 % (v/v). L'éthanol a été éliminé après une dernière étape de centrifugation. L'ADN a été ensuite repris dans 50 µL d'eau milli-Q contenant 100 mg/mL de RNase (Wizard Genomic DNA purification Kit, Promega) et incubé 15 minutes à 37 °C. L'ADN a ensuite été réhydraté à 4 °C durant la nuit puis conservé à -20 °C.

## **2.3 Amplification des cassettes**

Deux couples d'amorces ont été utilisés : P738/739 (5'-GTACCTACTACTTTGAATTGTACTACC-3'/5'-CTTGATAACTGTTACTGATATGTCTGAG-3') pour la cassette YFP et P990/991 (5'-TCCGCATTTAGACAACACACA-3'/5'-AGAAGCAAAAGCAGCAAAGC-3') pour la cassette KAN.

### **2.3.1 Cassette YFP**

L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 20 µL contenant 0,02 µM de chaque amorce, 4 µL de Tampon HF 5X™, 0,4 µL de dNTP, 0,2 µL de Taq phusion (New England biolabs, Ipswich, Grande Bretagne) et 1 µL d'ADN. Le volume a été complété à 20 µL avec de l'eau Milli-Q stérile. L'amplification a été effectuée en thermocycleur (I-cycler, Biorad) selon le programme suivant: 30 secondes de dénaturation initiale à 98 °C suivies de 25 cycles dénaturation (98 °C-8 sec)-hybridation (55°C-20 sec)-élongation (72 °C- 1 min 30) et d'une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes.

Les fragments amplifiés ont une taille comprise entre 2000 et 3000 pb. La Taq phusion permet d'amplifier les fragments de grande taille. L'amplification a été vérifiée en déposant les échantillons sur gel d'agarose 1% (cf paragraphe 4.3, matériels et méthodes partie 1). Le marqueur de taille utilisé est le λ/Eco RI/Hind III (Life Technologies, Carlsbad, Etats-Unis). Le résultat d'amplification est présenté sur la figure 24.

### **2.3.2 Cassette KAN**

L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 20 µL contenant 0,15 µM de chaque amorce, 4 µL de Mix Taq-&GO Ready-to-use PCR Mix™ (MP Biomedical, Santa Ana, Etats-Unis), 0,2 µL de Taq polymérase (MP Biomedical) et 1 µL d'ADN. Le volume a été complété à 20 µL avec de l'eau Milli-Q stérile. L'amplification a été effectuée en thermocycleur (I-cycler, Biorad) selon le programme suivant: 1 minute de dénaturation initiale à 95 °C suivie de 25 cycles de dénaturation (95 °C-30 sec)-hybridation (54°C-1 min)-élongation (72 °C- 2 min) et d'une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes.

Les fragments amplifiés ont une taille d'environ 1700 pb, l'amplification est visualisée sur gel d'agarose 1% (figure 24).

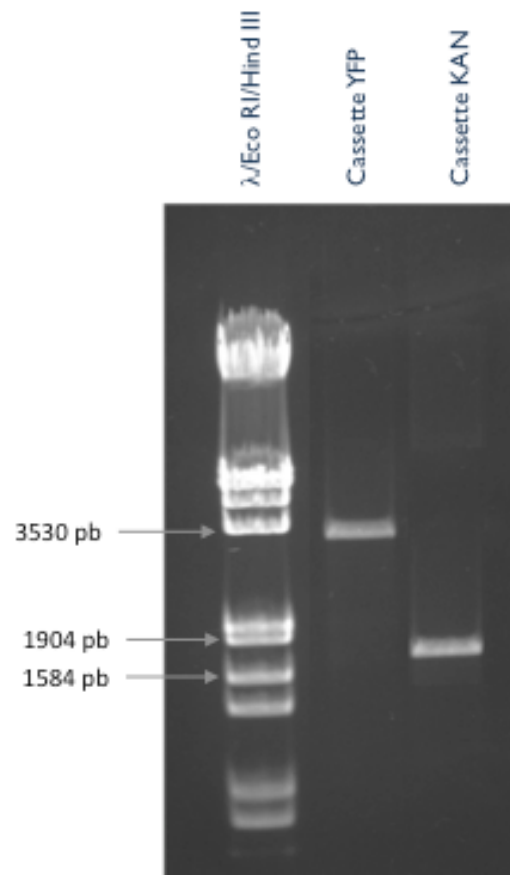


Figure 24: Visualisation d'amplification des cassettes YFP et KAN sur gel d'agarose

## 2.4 Transformation de la souche commerciale X5

### 2.4.1 Précipitation des cassettes et dosage d'ADN

1/10<sup>ème</sup> de volume d'acétate de sodium (pH 5,2, 0,3 M final) a été ajouté aux deux suspensions d'ADN contenant chaque cassette. Après homogénéisation, 2 volumes d'éthanol absolu à -20 °C ont été ajoutés puis les tubes ont été incubés 50 minutes à -80 °C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (13 000 rpm, 15 min, 4°C) et les surnageants éliminés. L'ADN a été rincé avec 1 mL d'éthanol à 70%. Après une seconde centrifugation (13 000 rpm, 20 min, 4°C), le surnageant a été éliminé, l'ADN précipité a été repris dans 50 µL d'eau milli-Q et conservé à -20 °C.

Avant de transformer les cellules de *S. cerevisiae*, la concentration de l'ADN précipité ( $DO_{260}$ ) et sa pureté ( $DO_{260}/DO_{280}$ ) ont été déterminées par spectrophotométrie en micro-volume (BioSpec-nano, Shimadzu, Japon).

#### 2.4.2 Protocole de transformation

La souche *S. cerevisiae* X5 a été dans un premier temps transformée avec la cassette YFP, puis, un clone X5-YFP a été transformé avec la cassette KAN.

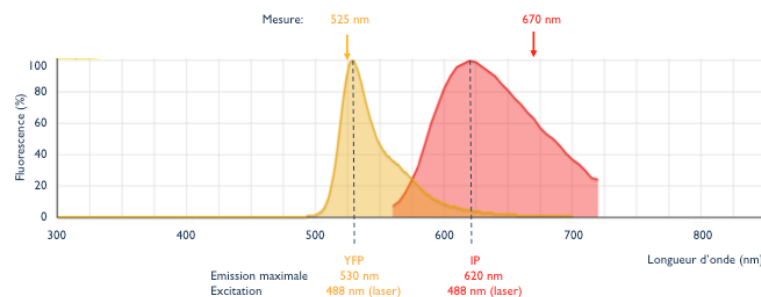
Une suspension a été réalisée en milieu YPD liquide à partir d'une culture de X5 sur milieu solide (cf partie 1 matériels et méthodes chapitre 2.2). L'absorbance de cette suspension a été mesurée par spectrophotométrie à 600 nm puis 50 mL de milieu YPD liquide ont étéensemencés à 0,001 de DO. La culture a été placée sous agitation orbitale à 125 rpm à 24 °C. Lorsque la densité optique a atteint une valeur comprise entre 0,6 et 1 (environ 16h de culture), la culture a été centrifugée 5 minutes à 3000 g. Le culot cellulaire a été lavé avec 5 mL de TE/LiAc stérile (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 5 mM, Acétate de Lithium 0,5 M, Sigma Aldrich) puis centrifugé (5 min, 4500 g). Après élimination du surnageant, le culot a été resuspendu en TE/LiAc afin d'obtenir une concentration de  $2.10^9$  cellules /mL en utilisant l'équivalence suivante :  $1 DO_{600nm} = 2.10^7$  cellules/mL puis incubé 15 minutes à 30 °C sans agitation.

Les réactions de transformation ont été réalisées en triplicata selon la méthode décrite par Gietz and Schiestl (1991). 50 µL de suspension cellulaire ont été introduits dans des tubes contenant 326 µL de mélange réactionnel pour transformation (Polyéthylène glycol, 36,5% (p/v) Acetate de Lithium 0,11 M, DMSO 1%, « DNA carrier » (ADN de sperme de saumon dénaturé 5 minutes à 95 °C, 2 mg/mL) Sigma Aldrich), et 2,5 µg d'ADN précipité (cassette YFP ou KAN). Les tubes ont ensuite été incubés 30 minutes à 30 °C sans agitation puis 15 minutes 42 °C au bain-marie. Après centrifugation (30 secondes, 13 000 rpm), les surnageants ont été éliminés et les culots repris dans 1 mL de milieu YPD liquide. Après 4h d'incubation à 30 °C, une dernière étape de centrifugation a permis de concentrer la suspension cellulaire (élimination de 800 µL du surnageant) et les 200 µL restants ont été étalés sur YPD solide + antibiotique (100µg/ml). Les cellules ayant intégré les cassettes présentent une résistance à la nourseothricine (Sc PLC(YFP)) et à la kanamycine (Sc PLL(YFP)).

## 2.5 Mesure de la fluorescence par cytométrie de flux et sélection des clones

### 2.5.1 Mesure de la fluorescence émise lors de l'expression du gène codant pour la protéine YFP

Les échantillons ont été préparés en tampon Mc Ilvaine et en présence de iodure de propidium (IP) comme marqueur de mortalité de la même façon que dans le paragraphe n° 2.3 de la partie 1 (matériels et méthodes). La protéine YFP et l'IP sont caractérisés par des longueurs d'ondes d'émission respectives de 525 et 670 nm (figure 25). Comme précisé dans le paragraphe n° 2.3 de la première partie de ce travail (matériels et méthodes), le cytomètre est équipé d'un filtre laissant passer les longueurs d'ondes supérieures à 670 nm permettant la détection de la fluorescence de l'IP sur le canal FL3. Un second filtre permet de mesurer la fluorescence émise à 525 nm, détectée sur le canal FL1.



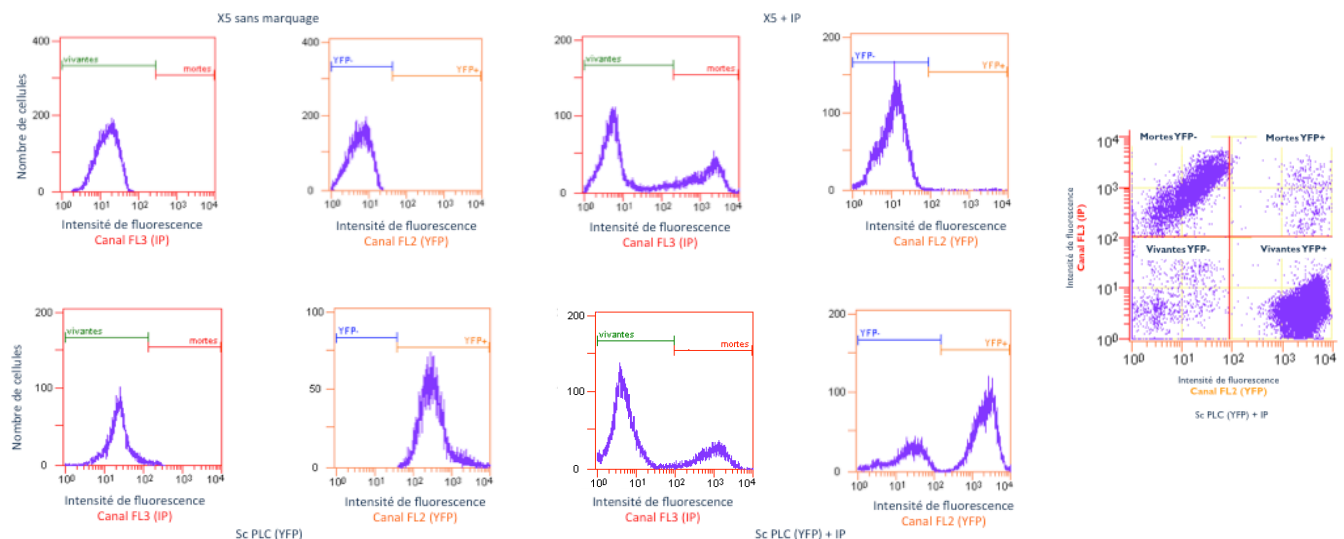
**Figure 25: Spectres d'émission de la protéine YFP et de l'IP**

A partir de 560 nm, un chevauchement partiel des spectres d'émission de la protéine YFP et de l'IP est observé. Néanmoins, les mesures étant effectuées à 525 et 670 nm, cela n'entraîne pas de sur ou sous estimation de l'une ou l'autre des fluorescences émises.

Différents types de suspensions cellulaires ont été réalisées afin d'effectuer ces réglages :

- Souche sans marquage (souche commerciale *S. cerevisiae* X5)
- Souche commerciale marquée uniquement avec l'IP
- Souches Sc PLC(YFP) ou Sc PLL(YFP)
- Souches Sc PLC(YFP) ou Sc PLL(YFP) marquées avec l'IP

Afin d'obtenir une séparation efficace des levures vivantes et mortes d'une part, et des levures YFP+ et YFP- d'autre part, les tensions des photomultiplicateurs ont été fixées à 6,93 mV pour le canal FL3 et à 7,03 mV pour le canal FL2. Le type de cytogramme obtenu pour les différentes suspensions cellulaires est présenté sur la figure 26.



**Figure 26: Séparation des cellules mortes, vivantes, YFP+ et YFP- par cytométrie en flux**

## 2.5.2 Sélection des clones

### 2.5.2.1 Souche de *S. cerevisiae* YFP+

Dans un premier temps la souche commerciale X5 a été transformée avec la cassette YFP. A l'issue du protocole de transformation, la fluorescence des différents clones obtenus a été mesurée par cytométrie en flux afin de vérifier l'expression du gène codant pour la protéine YFP. Les clones pour lesquels une fluorescence était détectée sur le canal FL2 ont été conservés et des fermentations alcooliques ont été effectuées en bioréacteurs de 125 mL en moût de raisin blanc. La croissance et la fluorescence ont été déterminées au cours de la fermentation par cytométrie en flux et le CO<sub>2</sub> dégagé par pesées régulières des bioréacteurs (cf paragraphe 3.3 de cette partie). Le clone le plus performant, c'est-à-dire terminant le plus rapidement la fermentation alcoolique et pour lequel la fluorescence était détectée tout au long de la fermentation, a été conservé et utilisé pour réaliser la transformation avec la cassette KAN afin d'obtenir des levures *S. cerevisiae* à phase de latence longue.

### 2.5.2.2 Souche de *S. cerevisiae* YFP+ à phase de latence longue

A l'issue de cette deuxième transformation, la fluorescence des différents clones a de nouveau été de nouveau mesurée par cytométrie en flux. Puis, afin de déterminer au sein de quelle copie du gène *SSU1* a été insérée la cassette KAN, différentes PCR ont été réalisées (figure 27).



**Figure 27: Couples d'amorces utilisés pour déterminer le chromosome d'insertion de la cassette KAN**

P1031 : 5'-CATGTTAGGGAGACCAACGA-3' (début de séquence amplifiée en amont du gène *SSU1* sur la chromosome XV);  
P759 : 5'-TCAAAGACAACCCCAATGTG-3' (début de séquence amplifiée à l'intérieur du gène *SSU1*);  
P788 : 5'-TCTTTTGGGCTGGTAGGAT-3' (début de séquence amplifiée en amont du gène *SSU1* sur le chromosome XVI);  
P560bis : 5'- CGGCGCAGGAACACTG -3' (début de séquence amplifiée à l'intérieur de la cassette KAN). Taille des fragments amplifiés: P1031/P759 = 535 pb, P788/P560bis = 2058 pb, P1031/P560bis = 1164 pb et P788/P759 = 1433 pb

Des fermentations alcooliques ont ensuite été réalisées avec les clones présentant une amplification positive uniquement pour le couple d'amorces P1031/P560bis pour sélectionner le clone qui sera utilisé dans la suite des essais.

### 3 Fermentations alcooliques

L'impact de deux facteurs de l'environnement ou abiotiques (saturation du moût en CO<sub>2</sub> et supplémentation du moût avec différents produits commerciaux dérivés de levures riches en lipides) a été étudié sur les deux souches de *S. cerevisiae* sélectionnées préalablement (Sc PLC-YFP et Sc PLL-YFP) et cinq espèces de non-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp., *C. zemplinina*, *H. uvarum* et *P. kluyveri*). Dans un premier temps, les fermentations ont été effectuées en cultures pures, puis en cultures mixtes (mélange des 5 espèces de non-*Saccharomyces*) en présence ou non de *S. cerevisiae*.

#### 3.1 Moût

Les fermentations alcooliques ont été réalisées en moût Sauvignon blanc (millésime 2013, vignobles Ducourt, Bordeaux), conservé à -20 °C. Avant chaque fermentation, la teneur en azote assimilable du moût est ajusté à 200 mg/L d'azote assimilable avec du Thiazote® (Laffort), afin d'assurer le bon déroulement des fermentations.

Le moût a ensuite été stérilisé par filtration sur membrane 0,45 µm en acétate de cellulose (Sartorius). La composition du moût après filtration est donnée dans le tableau 9.



**Tableau 9: Composition du Sauvignon Blanc 2013**

Sucres réducteurs	197	g/L
Titre alcoométrique probable	11,94	% vol.
Acidité totale	4,02	g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Acide L-malique	5,64	g/L
pH	3,41	
Dioxyde de soufre libre	14	mg/L
Dioxyde de soufre total	56	mg/L
Azote assimilable	208	mg/LN
Azote alpha aminé	188	mg/LN
Azote ammoniacal	20	mg/LN

### 3.2 Pré-cultures (levains)

Pour les levures non-*Saccharomyces Metschnikowia* spp., *C. zemplinina*, *H. uvarum* et *C. zemplinina*, deux étapes de pré-cultures ont été nécessaires. Dans un premier temps, 30 mL de milieu YPD liquide ont étéensemencés avec 1cm<sup>2</sup> de biomasse cultivée sur milieu YPD solide. Ces levains ont été incubés 24h à 24 °C sous agitation magnétique à 350 rpm. 5 mL de levain ont ensuite été prélevés pour inoculer 50 mL de moût dilué au ½ avec de l'eau Milli-Q stérile. Les levains ont à nouveau été incubés 24h à 24 °C sous agitation (350 rpm).

Pour les deux souches de *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*, une seule étape de pré-culture a été nécessaire. Les levains ont été réalisés dans des Erlenmeyers de 100 mL contenant 50 mL de moût dilué au ½ avec de l'eau Milli-Q stérile. Les Erlenmeyers ont étéensemencés avec 1cm<sup>2</sup> de biomasse cultivée sur milieu YPD solide. Les levains ont ensuite été incubés 24h à 24 °C sous agitation magnétique à 200 rpm pour *S. cerevisiae* et 350 rpm pour *T. delbrueckii*.

Après 24h, la concentration et la viabilité cellulaire des levains ont été déterminées par cytométrie en flux.

### 3.3 Fermentations en bioréacteurs 125 mL

L'ensemble des fermentations de cette partie a été réalisé en bioréacteurs (fermenteurs) contenant 125 mL de moût (figure 28). Après inoculation, les fermenteurs ont été fermés hermétiquement avec un bouchon en silicone. Une première aiguille, courte, permet le dégagement du CO<sub>2</sub>. Une seconde aiguille avec une seringue est utilisée pour les prélèvements.

Le dégagement de CO<sub>2</sub> au cours de la fermentation alcoolique entraînant une perte de masse, des pesées régulières des fermenteurs ont permis de suivre le déroulement de la fermentation. L'ensemble des fermentations a été réalisé en triplicata à 18 °C sous agitation magnétique à 250 rpm.

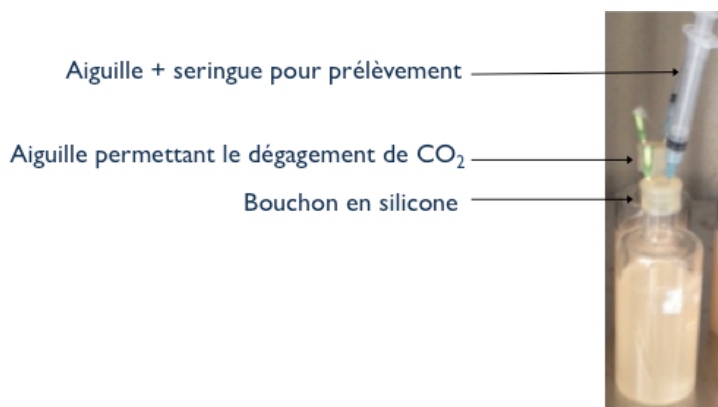


Figure 28: Bioréacteur 125 mL

#### 3.3.1 Saturation des fermenteurs en CO<sub>2</sub> et en azote

Au cours de la fermentation alcoolique, la concentration en CO<sub>2</sub> dissout augmente progressivement jusqu'à atteindre une valeur de 1,2 g/L correspondant à la saturation.

Afin d'étudier l'effet de la saturation en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique, du CO<sub>2</sub> gazeux a été introduit dans les fermenteurs en condition stérile (filtre à air de porosité 0,45 µm) juste après l'inoculation grâce à des diffuseurs en inox permettant la diffusion de bulles de petite taille (figure 29). Le CO<sub>2</sub> a été ajouté dans chaque fermenteur pendant 7 minutes à une pression de 0,5 bar, temps nécessaire pour obtenir la saturation en CO<sub>2</sub> dissout de 1,2 g/L. Les bioréacteurs ont été fermés hermétiquement par des bouchons en silicone. Un équilibre s'est alors créé entre le liquide et l'espace de tête du fermenteur, pour atteindre une concentration en CO<sub>2</sub> dissout comprise entre 1,05 et 1,1 g/L. Les fermenteurs ont ainsi été maintenus fermés

hermétiquement jusqu'au démarrage de la fermentation alcoolique, se traduisant par l'apparition de bulles en surface. A cet instant, les aiguilles et la seringue ont été rajoutées.

Afin d'éviter la diminution de la concentration en  $\text{CO}_2$  dissout lors des prélèvements réalisés avant le démarrage de la fermentation alcoolique des fermenteurs ont été sacrifiés à chaque fois.



**Figure 29: Saturation des fermenteurs en  $\text{CO}_2$**

La saturation des fermenteurs en  $\text{CO}_2$  a entraîné une diminution de la concentration en oxygène dissout du moût de 6 mg/L à 2 mg/L. Afin de s'assurer que les effets observés étaient bien dus à la présence de  $\text{CO}_2$  et non à la diminution de la quantité d'oxygène disponible, une étude préliminaire a été réalisée en remplaçant le  $\text{CO}_2$  par du  $\text{N}_2$ . Ce dernier a été ajouté dans les fermenteurs jusqu'à obtenir une concentration en oxygène dissout de 2 mg/L.

### **3.3.2 Supplémentation du moût avec un produit commercial dérivé de levure**

Six produits commerciaux de la société Laffort étaient à notre disposition lors de cette étude (produits A à F). Une attention particulière a été apportée à leur composition lipidique. Plusieurs critères ont été pris en compte afin de sélectionner les produits qui seront utilisés pour supplémenter le moût lors de la fermentation alcoolique : quantité totale d'acides gras et de stérols, quantité d'acides gras insaturés, rapport acides gras insaturés/saturés, quantité de squalène et d'ergostérol et rapport ergostérol/squalène. L'analyse après supplémentation avec ces différents produits a permis de vérifier qu'ils ne permettaient pas d'augmenter la teneur en azote assimilable des les moûts. Les produits ont été ajoutés dans le moût à 20 g/hL (dose maximale autorisée par la législation), après avoir été préalablement solubilisés dans 500  $\mu\text{L}$  d'une solution à 50% d'éthanol.

### 3.3.3 Essais en culture pure

Dans un premier temps, des cultures pures ont été effectuées avec les 7 souches présentées dans le chapitre n° 1 de cette partie (*T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp., *C. zemplinina*, *P. kluyveri*, *H. uvarum*, *S. cerevisiae* phase de latence courte (PLC-YFP) et *S. cerevisiae* phase de latence longue (PLL-YFP)). Les fermenteurs ont été inoculés à  $10^6$  cellules viables/mL.

### 3.3.4 Essais en culture mixte

Différents types cultures mixtes ont été réalisées:

- mélange constitué uniquement des levures non-*Saccharomyces* (5 espèces)
- mélange non-*Saccharomyces* + *S. cerevisiae* phase de latence courte, fluorescente (Sc PLC-YFP), en co-inoculation
- mélange non-*Saccharomyces* + Sc PLC-YFP en inoculation séquentielle (addition de *S. cerevisiae* après 24h de fermentation alcoolique)
- mélange non-*Saccharomyces* + *S. cerevisiae* phase de latence longue, fluorescente (Sc PLL-YFP), en co-inoculation

Les concentrations utilisées ont été choisies afin de recréer une population représentative de celle retrouvée dans les moûts en début de fermentation : *H. uvarum* ( $3.10^5$  cell vivantes/mL), *C. zemplinina* et *Metschnikowia* spp. ( $10^5$  cell vivantes/mL), *T. delbrueckii* et *P. kluyveri* ( $5.10^4$  cell vivantes/mL). *S. cerevisiae* (Sc YFP-PLC ou Sc YFP-PLL) a été inoculée à  $5.10^5$  cell vivantes/mL.

## 4 Suivi des populations

### 4.1 Cytométrie de flux

En cultures pures, le suivi des populations des différentes espèces a été effectué par cytométrie en flux. En mélange, seule la population de cellules vivantes *S. cerevisiae* a été quantifiée par cytométrie de flux. Le protocole utilisé a été décrit dans le paragraphe 2.5.1 de cette partie.

### 4.2 Milieu gélosé WL

Le milieu différentiel WL (Conda, Madrid, Espagne) a été utilisé pour dénombrer et différencier les espèces de levures non-*Saccharomyces* dans le mélange. La composition de ce milieu est donnée dans le tableau 10. Le milieu utilisé est prêt à l'emploi : 80 g de poudre sont diluées dans 1L d'eau milli-Q. Le pH final est de 5,5.

**Tableau 10: Composition du milieu WL (en g/L)**

Dextrose	50	Sulfate de magnésium	0,125
Tryptone	5	Vert de bromocrésol	0,022
Extrait de levure	4	Cycloheximide	0,004
Phosphate de potassium	0,55	Chlorure de fer	0,0025
Chlorure de potassium	0,425	Sulfate de manganèse	0,0025
Chlorure de calcium	0,125	Agar	20

La présence de cycloheximide dans le milieu inhibe la croissance de *S. cerevisiae*. Les boîtes ont été dénombrées après 7 jours d'incubation à 24 °C. En fonction de l'espèce, les colonies présentaient un aspect différent:

- *H. uvarum* → colonie de grande taille, vert foncé
- *C. zemplinina* → colonie de taille moyenne, bord blanc et centre vert clair
- *Metschnikowia* spp. → colonie de taille moyenne, blanche, base marron clair. Présence d'un halo marron autour des colonies.
- *T. delbrueckii* et *P. kluyveri* → petite colonie blanche. Seules ces deux espèces de notre mélange n'ont pas pu être différenciées en utilisant le milieu WL.

En culture pure, nous avons aussi vérifié, pour l'ensemble des souches, qu'il y avait une bonne adéquation entre la concentration cellulaire obtenue par dénombrement sur boîte (levures viables exprimées en UFC/mL) et celle obtenue par cytométrie en flux (exprimée cell viables/mL). Une différence de 10% à 18% a été obtenue en fonction des espèces et de la phase de croissance, en faveur de la cytométrie en flux. Cette différence a été jugée acceptable pour comparer les différentes populations.

## 5 Contrôles d'implantation

Des contrôles d'implantation ont été effectués en fin de fermentation pour les cultures pures.

L'extraction d'ADN a été réalisée grâce au dépôt sur carte FTA® de 6 µL de milieu de fermentation selon le protocole décrit dans le chapitre 4 du matériels et méthodes de la partie 1.

Les amorces et températures d'hybridation (T<sub>m</sub>) sont présentées dans le tableau 11.

**Tableau 11: Couple d'amorces et températures d'hybridation utilisées pour l'amplification par PCR des différentes espèces**

Espèce	Amorces	Température d'hybridation PCR
<i>S. cerevisiae</i>	SC1 (5'-GAAAACTCCACAGTGTGTG-3')/SC2 (5'-GCTTAAGTGCGCGGTCTTG-3')	63 °C
<i>T. delbrueckii</i>	Tods L2 (5'-CAAAGTCATCCAAGCCAGC-3')/ Tods R2 (5'-TTCTCAAACAATCATGTTTGGTAG-3')	63 °C
<i>Metschnikowia spp.</i>	MpL3(5'- CTCTCAAACCTCCGTTTG-3')/MpR3 (5'- GATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3')	60 °C
<i>C. zemplinina</i>	Cz2 (5'- CTTGGGTGTCGAAAGGCG-3')/CAST(5'- CAATATGCGTTCAAAAATTCAAT-3')	62 °C
<i>P. kluyveri</i>	Pk-rev(5'- GTCTGAGCGTCGTTTCCTTC-3')/Pk-for(5'- GGC CAAAGCGTGCTAAATG-3')	60 °C
<i>H. uvarum</i>	Hauf 2L(5'- CCCTTTCCTAAGGTACG-3')/Hauf 2R (5'- CGCTGTTCTCGCTGTGATG-3')	62 °C

L'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 20 µL contenant 0,25 µM de chaque amorce, 4 µL de Mix Taq-&GO Ready-to-use PCR Mix™ (MP Biomedical), et une pastille d'ADN. Le volume a été complété à 20 µL avec de l'eau Milli-Q stérile. L'amplification a été effectuée en thermocycleur (I-cycler, Biorad) selon le programme suivant: 1 minute de dénaturation initiale à 95 °C suivie de 25 cycles dénaturation (95 °C-30 sec)- hybridation (Tm-1 min)- élongation (72 °C- 30 sec) et d'une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes. L'amplification a été vérifiée en déposant les échantillons sur gel d'agarose 1% (cf paragraphe 4.3 du matériels et méthodes de la partie 1).

## 6 Activité protéolytique et dosage des protéines du raisin

### 6.1 Suivi de l'activité protéolytique

Un nouveau test a été développé afin de suivre l'activité protéase directement dans le moût en cours de fermentation. Pour cela, l'azocaséine (Sigma), un substrat de protéase chromogène, a été utilisée. La protéolyse de l'azocaséine entraîne une libération du colorant dans le surnageant pouvant être quantifié par mesure de la densité optique (DO) à 440 nm.

Une solution mère d'azocaséine à 20 mg/L a été préparée dans du NaOH 0,1M et ajoutée à 1,5 mg/mL dans les bioréacteurs. 500 µL d'échantillons ont été prélevés régulièrement au cours de la fermentation alcoolique. Lors de chaque prélèvement, la réaction est arrêtée avec 500 µL d'acide

trichloroacétique (10% final v/v, Sigma). Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 14 000 rpm pendant 10 minutes puis la DO du surnageant a été mesurée à 440 nm.

## **6.2 Dosage des protéines du raisin**

Afin de déterminer si les protéines du raisin ont été dégradées suite à l'action des protéases, un dosage des protéines du raisin a été réalisé selon le protocole décrit par Dubourdieu (1986). Ces dosages ont été effectués au laboratoire Sarco. A la fin de la fermentation alcoolique, 50 mL d'échantillons ont été centrifugés à 6000 rpm durant 5 minutes. Les macromolécules présentes dans le surnageant ont été analysées par HPLC de tamisage moléculaire (colonne TSKgel® G2000 SW, Phenomenex) selon le protocole décrit par Dubourdieu et al. (1986) permettant le fractionnement de molécules de 10 à 70 kDa. Trois classes de masses moléculaires peuvent être séparées par leur temps de rétention correspondant à trois fractions : P1 (> 50 kDa), P2 (40 kDa) et P3 (<30 kDa). Les protéines du raisin responsables de la casse protéique sont caractérisées par une masse moléculaire comprise entre 13 et 30 kDa (Waters et al., 1992) et peuvent ainsi être associées à la fraction P3.

## **7 Analyse de la composition lipidique des cellules de levures et du moût**

L'analyse des lipides des cellules de levures et du moût a été effectuée en début et en fin de fermentation alcoolique pour les différentes espèces.

### **7.1 Extraction lipidique**

#### **7.1.1 Cellules**

Des culots cellulaires ont été calibrés à  $2.10^9$  cellules par cytométrie en flux et rincés deux fois avec 20 mL d'eau milliQ stérile. Chaque culot a ensuite été repris dans 1 mL d'eau milliQ stérile puis transféré en tube eppendorf de 1,5 mL. Après centrifugation (6000 rpm, 5 min) et élimination du surnageant, les culots ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -20 °C.

Le protocole d'extraction est adapté de López-Malo et al. (2012). Les cellules ont été broyées en présence de 700 µL de méthanol à -20 °C, 140 µL d'EDTA 0,1M et 100 µL de microbilles de verre (acid-washed, 425-600 µm, Sigma, vibro-broyeur MM400, Retsch) suivant un programme de 4 x 1 min à la fréquence de 30 secousses/seconde. Quatre extractions successives ont été réalisées avec 2,5 mL de chloroforme : méthanol à différentes concentrations : deux extractions en présence de

chloroforme : méthanol 2 : 1, puis une en présence de 1 : 1 et une en présence de 1 : 2. A chaque extraction, après ajout du chloroforme : méthanol, les tubes ont été placés 45 minutes à 4 °C sur un agitateur rotatif puis centrifugés 5 minutes à 6000 rpm. La phase organique a ensuite été récupérée et transférée dans un nouveau tube.

Deux lavages successifs ont ensuite été effectués avec  $\frac{1}{4}$  de volume de KCl 0,88% sur les tubes contenant les phases organiques. Les tubes ont été placés 30 minutes à 4 °C sur un agitateur rotatif puis centrifugés 5 minutes à 6000 rpm. Les phases inférieures ont ensuite été récupérées et constituent l'extrait lipidique.

### **7.1.2 Moût**

Afin de réaliser l'extraction, 50 mL de moût ont été centrifugés à 8000 rpm 5 minutes. Trois extractions successives ont été effectuées avec 20 mL de chloroforme : méthanol 2 : 1. Les échantillons sont incubés 45 minutes à 4° C sous agitation magnétique (350 rpm), puis après décantation, les phases organiques ont été récupérées. De la même façon que pour les cellules, deux lavages successifs ont ensuite été effectués avec  $\frac{1}{4}$  de volume de KCl 0,88%. Les phases inférieures (extraits lipidiques) ont été récupérées après centrifugation.

## **7.2 Analyse des acides gras et stérols**

L'analyse des acides gras et des stérols a été effectuée à la plateforme de lipidomique du Laboratoire de Biogenèse Membranaire (UMR 5200 CNRS, Université de Bordeaux, INRA Bordeaux Aquitaine).

### **7.2.1 Acides gras**

L'analyse des acides gras a été réalisée à partir de  $\frac{1}{6^{\text{ème}}}$  de volume d'extrait lipidique. Après concentration à sec sous azote, les acides gras ont été trans-méthylés durant 2h à 85 °C, en présence d'une solution de méthanol contenant 5% d'acide sulfurique (v/v) ainsi que 50 µg d'acide heptadécanoïque (C17) comme étalon interne (Sigma Aldrich). Après refroidissement, 1 mL de NaCl 2,5% ont été ajoutés et 2 mL d'hexane ont permis d'extraire les esters méthyliques d'acides gras. Cette phase a été récupérée puis, après concentration à sec sous azote, les acides gras ont été remis en suspension dans 200 µL d'hexane.

La composition en acides gras a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID).

L'ensemble des caractéristiques de l'appareillage et de la méthode d'injection sont présentés dans le tableau 12.



**Tableau 12: Analyse des acides gras en GC-FID**

Appareil	Système Agilent technologies 7890A équipé de détecteur à ionisation de flamme
Colonne	Carbowax, 15 m x 0,53 mm d.i. (Alltech)
Température initiale du four	160 °C
Programme de température	160°C - 1min puis 20°C/min jusqu'à 190 °C, 5°C/min jusqu'à 210 °C
Température d'injection	210 °C
Volume injecté	1 µL
Gaz vecteur	Helium, débit 9 mL/min
Logiciel d'acquisition	MSD Chemstation (Agilent Technologies)

### 7.2.2 Stérols

L'analyse des stérols a été réalisée à partir de 2/3<sup>ème</sup> de volume d'extrait lipidique. Après concentration à sec sous azote, 1 mL de solution d'éthanol absolu a été ajoutée contenant 50 µg de cholestanol (étalon interne, Sigma Aldrich). Une réaction de saponification a été réalisée pendant 1h à 80 °C en présence de KOH 11M (Sigma Aldrich). La phase insaponifiable (supérieure) contenant les stérols a été récupérée après ajout de 1 mL d'hexane et 2 mL d'eau milli-Q. Après concentration à sec sous azote, les stérols ont été dérivatisés en présence de 200 µL de mélange BSTFA-TMCS (Sigma Aldrich) à 110 °C pendant 15 minutes. Les échantillons ont une nouvelle fois été concentrés à sec puis les stérols ont été remis en suspension dans 200 µL d'hexane.

La composition en stérols a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). L'ensemble des caractéristiques de l'appareillage et de la méthode d'injection est présenté dans le tableau 13.

**Tableau 13: Analyse des stérols en GC-MS**

Appareil	Système Agilent technologies 6850 couplé à un spectromètre de masse (MSD 5975, Agilent)
Colonne	HP-5MS, 30 m x 0,25 mm (d.i.), 0,22 µm (e.f.) (Agilent technologies)
Température initiale du four	50 °C
Programme de température	50°C - 10min puis 25°C/min jusqu'à 150 °C, 10°C/min jusqu'à 250 °C, isotherme final 5 min
Température d'injection	250 °C
Volume injecté	1 µL
Gaz vecteur	Helium, débit 1,5 mL/min
Logiciel d'acquisition	MSD Chemstation (Agilent Technologies)

## 8 Analyses courantes et thiols volatils en fin de fermentation

Les dosages de l'alcool, des sucres, du SO<sub>2</sub>, du glycérol et des thiols volatils ont été effectués de la même façon que dans la première partie de ce travail (cf chapitre 5, matériels et méthodes partie 1).

## 9 Calcul des paramètres de croissance et de fermentation alcoolique – Analyses statistiques

### 9.1 Calcul des paramètres

Pour chaque fermentation, différents paramètres ont été calculés sur les courbes de croissance et de dégagement de CO<sub>2</sub> à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2008). La durée de la phase de latence de fermentation alcoolique et la capacité biotique ont été déterminées de la même façon que dans la partie précédente (chapitre 6, matériels et méthodes partie 1).

- **Vitesse maximale de croissance (UFC ou cellules viables/mL/h)**

A chaque point de la courbe de croissance est calculée la vitesse instantanée de croissance. La vitesse retenue est la vitesse de croissance maximum. La vitesse est exprimée en cellules viables/mL/h dans le cas des cultures pures et de *S. cerevisiae* en mélange et en UFC/mL/h pour les non-*Saccharomyces* en mélange.

- **Taux de mortalité (nombre de cellules mortes/h)**

Le taux de mortalité correspond à la variation de population divisée par le temps entre la population maximale et la population en fin de fermentation.

- **Vitesse maximale de fermentation (Vmax, en g/L/h)**

Une interpolation linéaire est effectuée entre les points 2 à 2 sur la courbe de dégagement de CO<sub>2</sub> en fonction du temps. La pente maximale obtenue correspond à la vitesse maximale de fermentation.

## **9.2 Analyse statistique**

L'absence d'homocédasticité des variances nous a conduit à appliquer un test de Kruskal-Wallis pour comparer les paramètres de croissance, de cinétiques ainsi que les composés des vins finis. Le test de Kruskal-Wallis est l'équivalent de l'ANOVA en test non paramétrique.

## Résultats et Discussion

Dans cette partie l'impact de deux facteurs environnementaux ou abiotiques a été étudié sur le développement de *S. cerevisiae* et de différentes levures non-*Saccharomyces* : la supplémentation du moût avec un produit commercial dérivé de levures, riche en lipides, et la saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique. Des essais ont été réalisés en cultures pures puis en mélange, constitué de plusieurs espèces de non-*Saccharomyces* avec ou sans *S. cerevisiae*.

Cinq espèces de non-*Saccharomyces*, fréquemment isolées des moûts, ont été étudiées : *T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp., *C. zemplinina*, *H. uvarum* et *P. kluyveri*. Dans un premier temps, des tests préliminaires ont été réalisés afin de sélectionner, pour chaque espèce, une souche capable de démarrer rapidement dans nos conditions de fermentation (moût Sauvignon Blanc, 18 °C sous agitation 250 rpm) et/ou présentant des propriétés (enzymatiques, aromatiques) d'intérêt.

Deux souches de *S. cerevisiae* ont été utilisées : l'une à phase de latence courte et l'autre à phase de latence longue. L'utilisation d'une souche à phase de latence longue, démarrant la fermentation alcoolique plus tardivement, présente un intérêt car elle peut permettre de laisser le temps aux non-*Saccharomyces* de se développer. Néanmoins, nous ne disposons pas de souche à phase de latence longue dans le même fond génétique que la souche à phase de latence courte choisie. De plus, afin de suivre l'évolution de la population de *S. cerevisiae* indépendamment de celle des levures non-*Saccharomyces* lorsqu'elles sont cultivées en mélange, des souches de *S. cerevisiae* fluorescentes ont dû être développées. L'élaboration de souches de *S. cerevisiae*, marquées et à phase de latence longue, a nécessité plusieurs étapes de transformation et de sélection.

Six produits commerciaux étaient à disposition pour cette étude. L'analyse de la composition en lipides (acides gras et stérols) de ces différents produits a permis de sélectionner trois produits de composition lipidique différente pour supplémenter le moût. Nous avons également étudié l'impact d'une saturation rapide en CO<sub>2</sub> juste après l'inoculation sur le démarrage de la croissance et de la fermentation alcoolique. Cependant, la saturation en CO<sub>2</sub> entraîne une diminution de la concentration en O<sub>2</sub> dissout, ce qui peut affecter la croissance des levures. Afin de déterminer dans quelle mesure la saturation en CO<sub>2</sub> et/ou la diminution en O<sub>2</sub> dissout affectent la croissance, des fermentations en cultures pures ont, dans un premier temps, été réalisées en présence de CO<sub>2</sub> et en présence d'azote, dans les mêmes conditions d'O<sub>2</sub> dissout.

# 1 Etudes préliminaires

## 1.1 Choix des souches

### 1.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

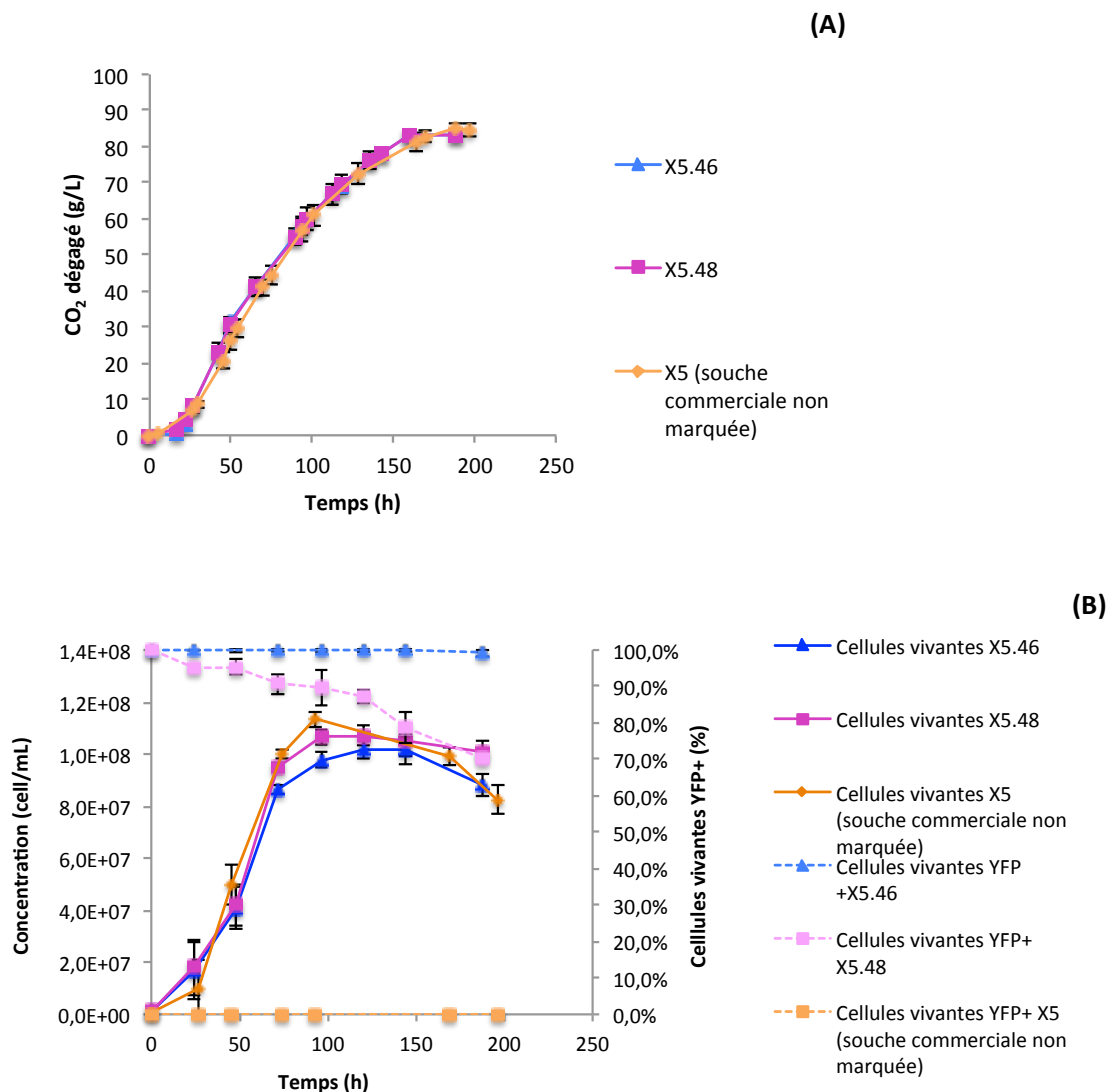
La souche *S. cerevisiae* Zymaflore X5 (Laffort Œnologie) a été choisie car elle est caractérisée par une forte aptitude à libérer les thiols volatils à partir des précurseurs cystéinylés (Masneuf-Pomarède et al., 2006). Cette souche a été génétiquement modifiée afin, d'une part, d'exprimer constitutivement la protéine YFP permettant de déterminer sa population par cytométrie en flux indépendamment des autres souches non-*Saccharomyces* et, d'autre part, d'obtenir une souche ayant une phase de latence plus longue que la souche commercialisée. L'utilisation d'une souche de *S. cerevisiae* à phase de latence longue, c'est-à-dire démarrant plus tardivement la fermentation, présente un intérêt en vinification car elle devrait permettre de laisser plus de temps aux levures non-*Saccharomyces* pour se développer.

A l'issue de la première étape de transformation de la souche commerciale X5 avec la cassette YFP, 8 clones se sont développés sur milieu sélectif et ont été analysés par cytométrie en flux afin de mesurer leur fluorescence (tableau 14).

**Tableau 14: Mesure du pourcentage de cellules fluorescentes et de cellules viables pour les différents clones de *S. cerevisiae* X5 après transformation avec la cassette YFP**

Clone	YFP+ (%)	Vivantes (%)	Vivantes YFP+ (%)
X5.45	0,42%	99,29%	0,42%
X5.46	98,80%	99,68%	99,12%
X5.47	97,35%	99,84%	97,51%
X5.48	99,06%	99,64%	99,42%
X5.49	36,55%	98,43%	37,13%
X5.50	18,69%	96,37%	19,39%
X5.51	31,10%	98,45%	31,59%
X5.52	74,67%	95,96%	77,81%

Les clones 46 et 48 présentent les proportions de cellules vivantes exprimant la protéine YFP les plus élevées. Des fermentations alcooliques ont alors été effectuées avec ces 2 clones en bioréacteurs de 125 mL et moût Sauvignon Blanc afin de vérifier leur capacité fermentaire (capacité à dégrader la totalité des sucres) et suivre leur viabilité (figure 30).

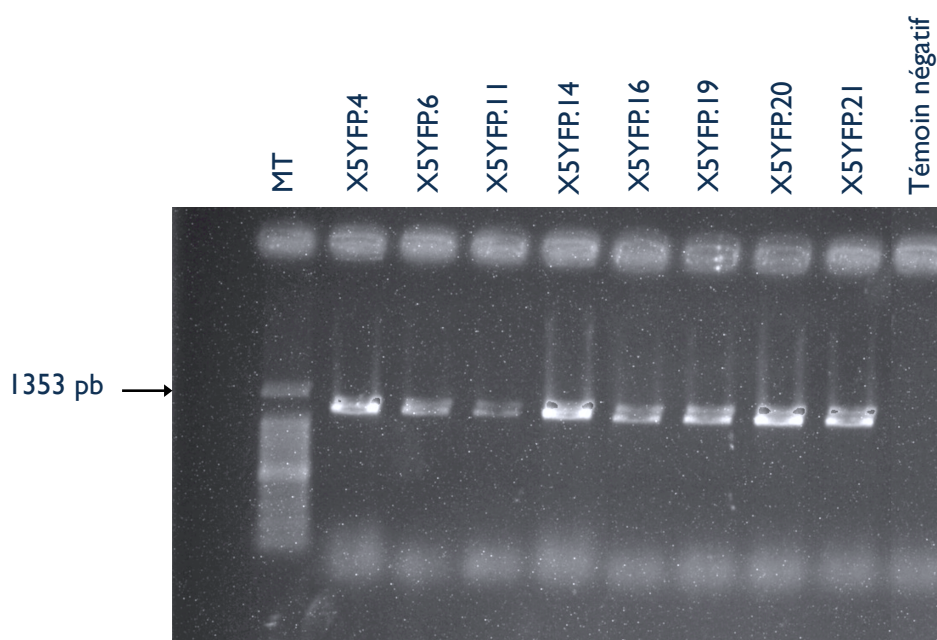


**Figure 30: Cinétiques de dégagement de CO<sub>2</sub> (A), de croissance et évolution de la proportion de cellules vivantes fluorescentes (B) des clones X5.46 et X5.48**

Les cinétiques de fermentation (ou de dégagement de CO<sub>2</sub>) sont similaires entre les 2 clones et par rapport à la souche commerciale non marquée. En revanche, la proportion de cellules vivantes YFP+ se maintient à une valeur proche de 100%, tout au long de la fermentation, pour le clone X5.46 alors qu'elle chute rapidement pour le clone X5.48. Le clone X5.46 est donc conservé pour la suite des essais et pour la construction de la souche X5 à phase de latence longue. Il sera noté Sc PLC-YFP.

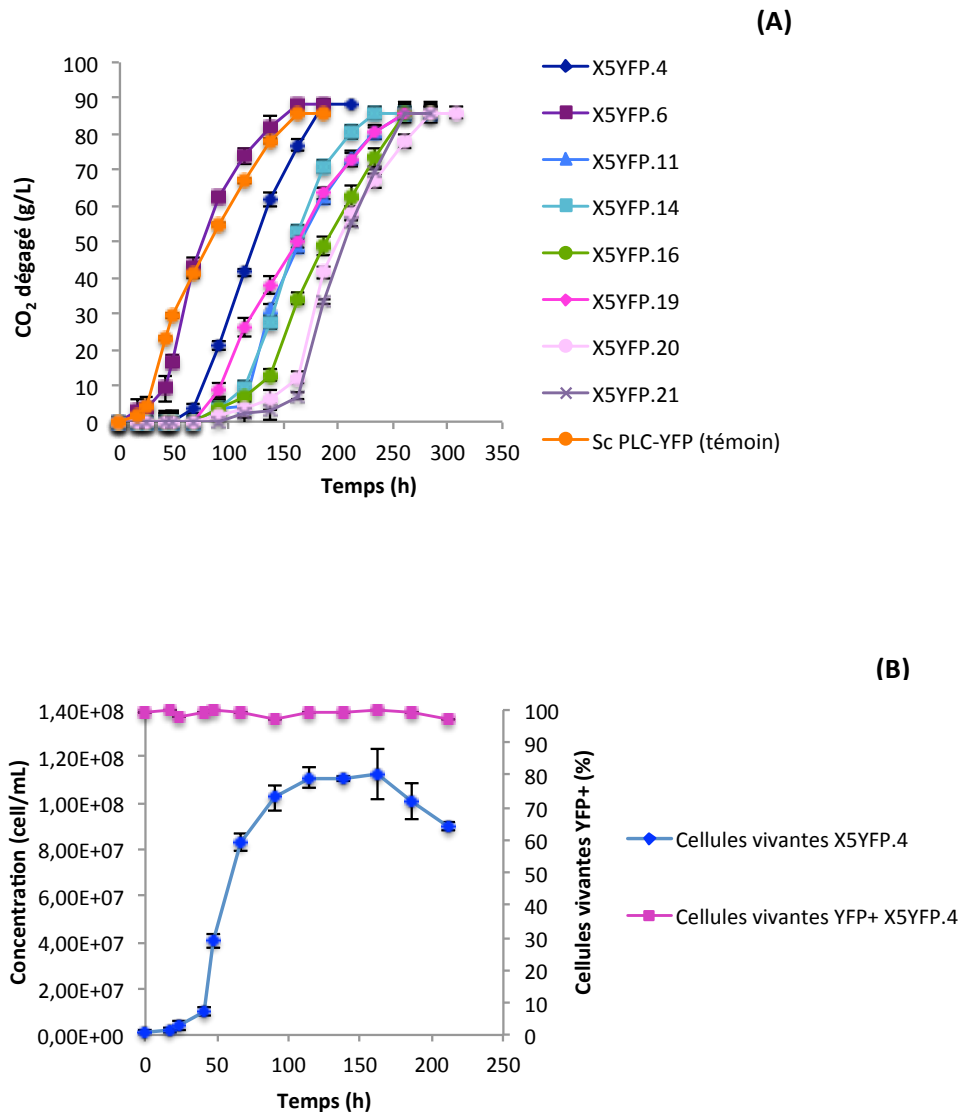
La souche Sc PLC-YFP a ensuite été transformée avec la cassette KAN afin d'obtenir une souche à phase de latence longue fluorescente. 17 clones se sont développés sur milieu sélectif et ont été analysés par cytométrie en flux afin de vérifier l'émission de fluorescence. Pour l'ensemble des

clones, la totalité des cellules vivantes est fluorescente, le gène codant pour la protéine YFP est exprimé. La cassette KAN a été insérée à l'intérieur du gène *SSU1* impliqué dans la durée de la phase de latence. Or, la souche X5 possède deux copies du gène *SSU1*, une sur le chromosome XV-t-XVI et une sur le chromosome XVI, la cassette KAN peut donc être insérée sur l'un ou l'autre des chromosomes. Cependant, seuls les clones possédant une copie du gène *SSU1* inactivé (grâce à la cassette KAN) sur le chromosome XV-t-XVI possèdent une phase de latence longue. Le chromosome d'insertion a été vérifié par PCR grâce aux amorces P1031, P759, P788 et P560bis. Une amplification positive avec le couple d'amorces P1031/P560bis (insertion de la cassette KAN sur le chromosome XV-t-XVI) est caractérisée par l'apparition d'une bande correspondant à un fragment de 1164 paires de bases (figure 31).



**Figure 31: Vérification de l'insertion de la cassette KAN au sein de la copie du gène *SSU1* présente sur le chromosome XV-t-XVI de *S. cerevisiae***

8 clones (X5YFP.4, X5YFP.6, X5YFP.11, X5YFP.14, X5YFP.16, X5YFP.19, X5YFP.20, X5YFP.21) possèdent un gène *SSU1* inactivé par la cassette KAN sur le chromosome XV-t-XVI. Des fermentations alcooliques ont alors été effectuées avec ces 8 clones en bioréacteurs de 125 mL et moût Sauvignon Blanc (figure 32). La durée des phases de latence des différents clones a été comparée à celle de la souche Sc PLC-YFP qui démarre la fermentation alcoolique dans les 20 heures suivant son inoculation.



**Figure 32: Cinétiques de fermentation alcoolique des 8 clones X5YFP (A), de croissance et évolution de la proportion de cellules vivantes fluorescentes du clone X5YFP.4 (B)**

La phase de latence de la souche témoin (Sc PLC-YFP) est de 19h. Parmi les 8 clones testés de grandes variations ont été observées au niveau de la durée de cette phase (23h à 114h). Les durées de fermentation, hors durée de la phase de latence, sont proches de celles de la souche témoin sauf pour le clone X5YFP.19. Le clone X5YFP.4, ayant une phase de latence de 66h soit 47h de plus que la souche Sc PLC-YFP, a été retenu.

Les suivis de population et les mesures de fluorescence par cytométrie en flux ont montré que la proportion de cellules vivantes YFP+ se maintient à une valeur proche de 100% tout au long de la fermentation (figure 32). Le clone X5YFP.4 sera donc conservé pour la suite et noté Sc PLL-YFP.



### 1.1.2 Levures non-*Saccharomyces*

#### 1.1.2.1 *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Candida zemplinina* et *Torulaspora delbrueckii*

Les espèces *P. kluyveri* et *H. uvarum* n'ayant pas été préalablement étudiées au laboratoire, un « screening » de 15 souches de *P. kluyveri* et 30 souches de *H. uvarum* (Centre de Ressources Biologiques Œnologiques, Bordeaux) a été effectué en microplaques. Il a permis de sélectionner *P. kluyveri* Pk.31 et *H. uvarum* L0666 du fait de leur capacité à démarrer leur croissance (mesure de la densité optique) en moins de 24h dans le moût Sauvignon Blanc utilisé lors de cette étude (résultats non présentés).

La souche *T. delbrueckii* Zymaflore Alpha (commercialisée par la société Laffort Œnologie), caractérisée et sélectionnée au laboratoire, a été choisie. Cette souche possède une bonne capacité fermentaire (phase de latence courte et production d'éthanol voisine de 10% (v/v)). Cette souche est recommandée pour diminuer l'acidité volatile des vins liquoreux et augmenter la complexité aromatique des vins blancs secs et rosés (Renault, 2010). La souche *C. zemplinina* PE401 a été également sélectionnée au laboratoire pour sa faible production d'H<sub>2</sub>S, son faible rendement éthanol/sucres (présentant ainsi un fort potentiel en terme de réduction de l'éthanol) et sa capacité à démarrer rapidement la fermentation alcoolique (Bely, 2013).

#### 1.1.2.2 *Metschnikowia* spp.

La souche *Metschnikowia* spp. L0563, déjà étudiée au laboratoire, a montré un potentiel intéressant au niveau aromatique. Des études ont montré que l'espèce *Metschnikowia pulcherrima* est capable de produire des protéases extracellulaires pouvant présenter un intérêt en œnologie (Charoenchai et al., 1997; Comitini et al., 2011; Fernández et al., 2000). Cependant, l'activité protéolytique de notre souche n'a jusqu'ici pas été étudiée. Afin de caractériser son activité, un test permettant de mesurer l'activité protéolytique des levures au cours de la fermentation alcoolique a été mis au point.

#### 1.1.2.2.1 Mesure de l'activité protéolytique : mise en place du test à l'azocaséine

Les différentes méthodes actuellement utilisées pour mesurer l'activité protéolytique des microorganismes, sont basées sur l'utilisation de milieux de laboratoire, solides ou liquides, dans des conditions souvent éloignées de celles rencontrées en œnologie. Notamment le pH n'est pas toujours ajusté à une valeur représentative du vin (3-3,5). De plus, même si les temps d'incubation varient en fonction des méthodes, cela reste long et relativement difficile à mettre en œuvre. La quantification est également très approximative.

L'azocaséine est un substrat de protéase qui, lorsqu'il est hydrolysé, libère dans le surnageant un composé coloré pouvant être quantifié par mesure de DO à 440 nm. Différentes concentrations de solution stock d'azocaséine (préparation en NaOH 0,1M) et concentrations finales dans les fermenteurs ont été testées afin de déterminer la quantité optimale d'azocaséine nécessaire pour avoir un excès de substrat dans les fermenteurs sans augmenter fortement le pH du moût. La concentration optimale de la solution mère a été fixée à 20 mg/mL et à 1,5 mg/mL de concentration finale dans les fermenteurs.

7 souches ont été utilisées pour réaliser différentes fermentations alcooliques: 4 *M. pulcherrima* (IWBT Y1123, Y6259, NZ366, L1329), *Metschnikowia* spp. L0563, *S. cerevisiae* X5 et *T. delbrueckii* Alpha. Les fermentations ont été effectuées en cultures pures en Sauvignon Blanc à 18 °C. Chaque souche est inoculée à  $5 \cdot 10^6$  cellules viables/mL. Le témoin négatif est constitué de moût non inoculé.

Dans un premier temps, afin de vérifier que l'azocaséine n'a pas d'impact sur la croissance et la cinétique fermentaire des fermentations, ont été réalisées avec et sans azocaséine pour 4 souches : *S. cerevisiae* X5, *T. delbrueckii* Alpha, *M. pulcherrima* IWBT Y1123 et *Metschnikowia* spp. CRBO L0563. L'ensemble des modalités est effectué en triplicata.

#### 1.1.2.2.2 Comparaison des fermentations avec et sans azocaséine

*S. cerevisiae* a dégradé la totalité des sucres ( $\text{CO}_2$  maximum attendu 92 g/L) alors que les fermentations en présence de *T. delbrueckii* et des deux souches de *Metschnikowia* n'ont permis de dégrader que 85% et 65% des sucres (tableau 15). Le test de Kruskal-Wallis, effectué sur les différents paramètres de croissance et de fermentation, a mis en évidence que l'azocaséine n'a pas

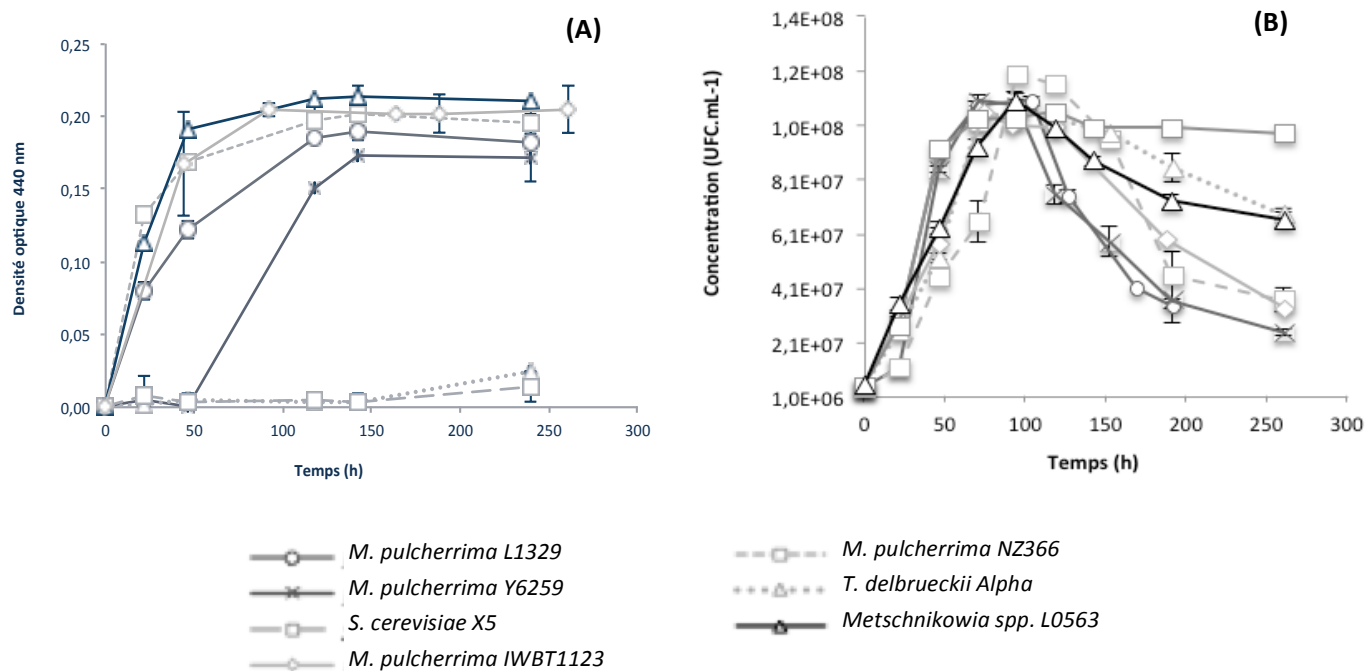
d'impact significatif sur les paramètres de croissance (vitesse maximale de croissance et capacité biotique) et de fermentation (phase de latence, Vmax et CO<sub>2</sub> maximum dégagé) des différentes espèces testées (p<0,05). Ce substrat peut donc être utilisé pour mesurer l'activité protéolytique des levures au cours de la fermentation alcoolique.

**Tableau 15: Paramètres de croissance et de fermentation avec et sans azocaséine**

		Vitesse maximale de croissance (UFC/mL/h)	Capacité biotique (cell.mL <sup>-1</sup> )	Phase de latence de fermentation (h)	Vmax (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	CO <sub>2</sub> maximum dégagé (g/L)
<b><i>S.cerevisiae</i> X5</b>	Sans azocaséine	0,14 ± 0,001	1,1x10 <sup>8</sup> ± 1,2x10 <sup>6</sup>	14,0 ± 0,2	1,07 ± 0,02	91,6 ± 2,76
	Avec azocaséine	0,10 ± 0,004	1,1 x10 <sup>8</sup> ± 1,4x10 <sup>6</sup>	11,2 ± 0,1	1,02 ± 0,01	91,7 ± 0,03
<b><i>T. delbrueckii</i> Alpha</b>	Sans azocaséine	0,11 ± 0,01	1,2 x10 <sup>8</sup> ± 1,4x10 <sup>7</sup>	27,4 ± 2,9	0,62 ± 0,13	77,4 ± 1,63
	Avec azocaséine	0,07 ± 0,002	1,1 x10 <sup>8</sup> ± 3,1x10 <sup>7</sup>	29,5 ± 0,1	0,58 ± 0,19	77,1 ± 0,88
<b><i>M. pulcherrima</i> IWBT1123</b>	Sans azocaséine	0,08 ± 0,003	1,1 x10 <sup>8</sup> ± 1,0x10 <sup>6</sup>	28,6 ± 1,0	0,41 ± 0,11	60,4 ± 2,40
	Avec azocaséine	0,07 ± 0,001	1,1 x10 <sup>8</sup> ± 4,7x10 <sup>6</sup>	26,3 ± 0,1	0,46 ± 0,09	59,8 ± 1,97
<b><i>Metschnikowia</i> spp. L0563</b>	Sans azocaséine	0,08 ± 0,002	1,1 x10 <sup>8</sup> ± 3,2x10 <sup>6</sup>	24,7 ± 0,3	0,37 ± 0,03	59,5 ± 0,77
	Avec azocaséine	0,07 ± 0,002	1,0 x10 <sup>8</sup> ± 3,2x10 <sup>6</sup>	24,1 ± 0,8	0,35 ± 0,03	60,5 ± 0,77

#### 1.1.2.2.3 Suivi de l'activité protéolytique des levures au cours de la fermentation alcoolique

L'évolution de la DO 440 nm des différentes cultures de levures est présentée sur la figure 33A et leur cinétique de croissance sur la figure 33B. Aucune variation n'est observée lorsque le moût n'est pas inoculé, suggérant que l'augmentation de la densité optique est le résultat du métabolisme des levures. Aucune variation n'est observée pour *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae* traduisant l'absence d'activité protéolytique et confirmant des travaux précédents (Charoenchai et al., 1997). En revanche, une forte augmentation de la DO 440 nm, reflétant une forte activité protéolytique, est observée pour l'ensemble des souches de *Metschnikowia* testées. L'activité protéolytique est détectée dès le démarrage de la croissance pour l'ensemble des souches sauf pour *M. pulcherrima* Y6259. Dans ce cas, l'activité cumulée devient maximale à la fin de la croissance. Dans cet essai, *Metschnikowia* spp. CRBO L0563 présente la plus forte activité protéolytique avec une augmentation de la densité optique jusqu'à 0,21.



**Figure 33 : Activité protéolytique (évolution de la DO440 nm) (A) et cinétiques de croissance (B) de différentes souches de levure durant la fermentation alcoolique.**

Afin de déterminer si l'activité protéolytique des différentes souches de *Metschnikowia* a un effet sur les protéines du raisin responsables de la casse protéique, un dosage de ces protéines a été effectué.

#### 1.1.2.2.4 Impact de la présence de *Metschnikowia* sur les protéines du raisin responsables de la casse protéique dans les vins blanc

A la fin de la fermentation alcoolique, le dosage des protéines du raisin responsables de la casse protéique (fraction P3, paragraphe 6.2, matériels et méthodes) a été effectué par HPLC de tamisage moléculaire pour les cultures de *S. cerevisiae*, *Metschnikowia* spp. CRBO L0563, *M. pulcherrima* IWB1123 et *M. pulcherrima* Y6259.

Aucune différence significative n'a été observée entre *S. cerevisiae* (55 mg eq BSA/L) et le moût non inoculé (54 mg eq BSA/L). En revanche, en présence des différentes souches de *Metschnikowia*, une diminution de 20% de la fraction P3 est observée par rapport au vin fermenté avec *S. cerevisiae*.

**Tableau 16: Analyse des protéines de la fraction P3 par HPLC en fin de fermentation alcoolique**

Souche	P3 (mg eq BSA/L)
<i>S. cerevisiae</i> X5	55 <sup>a</sup> ± 2
<i>Metschnikowia</i> spp. L0563	46 <sup>b</sup> ± 2
<i>M. pulcherrima</i> IWB T Y1123	46 <sup>b</sup> ± 2
<i>M. pulcherrima</i> Y6259	48 <sup>b</sup> ± 3

a,b: résultats du test de Kruskal-Wallis. Les souches avec une lettre différente présentent une différence significative (alpha=0,05)

La diminution de la concentration en protéines de la fraction P3 pourrait donc être le résultat de l'activité protéolytique de *Metschnikowia* mise en évidence en présence d'azocaséine. En revanche, l'effet de cette diminution sur la stabilité protéique et la composition du vin n'a pas été déterminé.

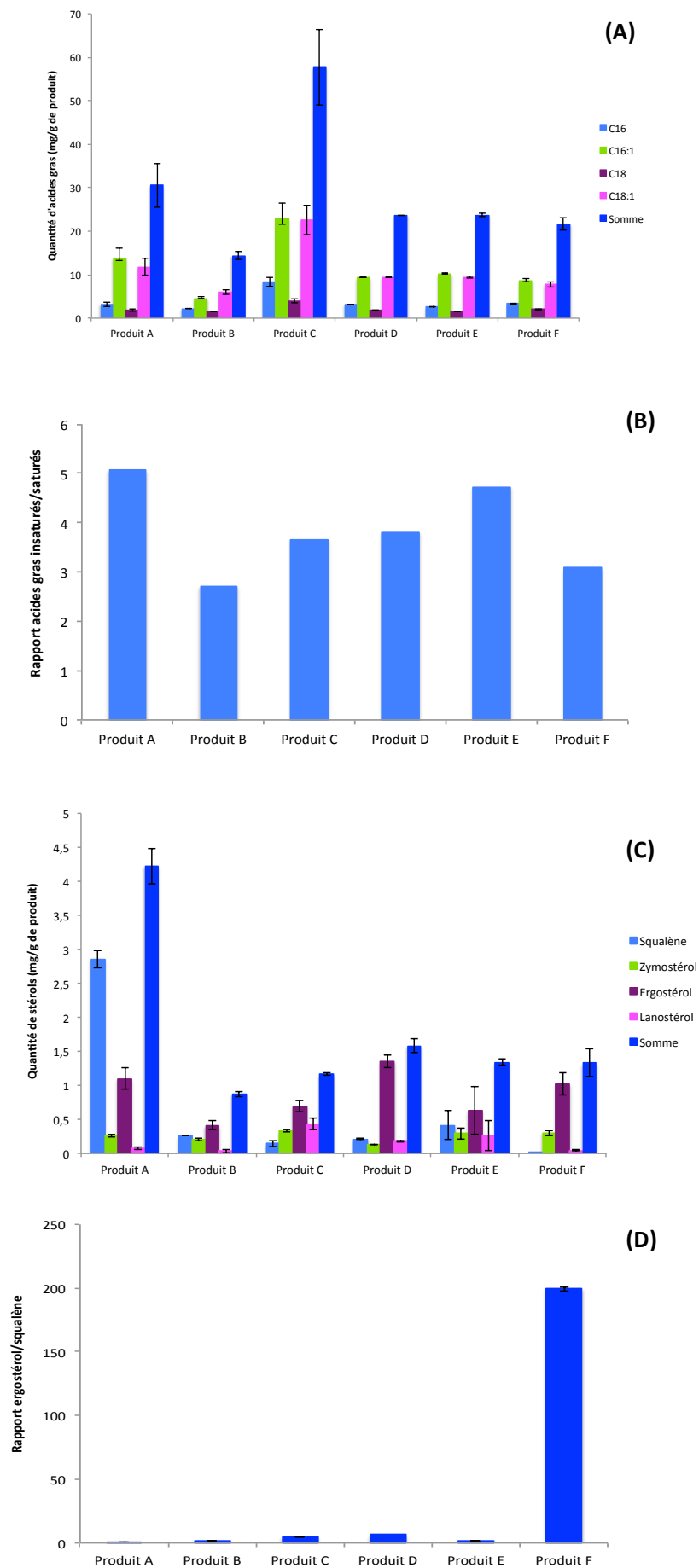
En conclusion, l'utilisation d'azocaséine permet de suivre et mesurer facilement l'activité protéolytique des levures au cours de la fermentation alcoolique du moût. Des différences ont pu être observées entre les souches de *Metschnikowia* en terme d'activité protéolytique. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans Journal of Microbiological Methods (acceptée le 30/10/2015, DOI : 10.1016/j.mimet.2015.10.025).

La souche *Metschnikowia* spp. CRBO L0563 fait partie des souches présentant une forte activité protéolytique parmi les souches testées et une bonne croissance dans le moût utilisé. Elle sera donc conservée pour les essais suivants.

## **1.2 Choix des produits commerciaux utilisés**

La sélection des produits commerciaux (dérivés de levures) a été réalisée sur la base de leur composition lipidique.

Le dosage des acides gras, des stérols et du squalène (précurseur des stérols) a été effectué sur 30 mg de chacun des 6 produits commerciaux (Laffort) à disposition (figure 34). Ces quantifications nous ont permis de calculer la quantité d'acides gras, le rapport acides gras insaturés/saturés, la quantité de stérols et le rapport ergostérol/squalène.



**Figure 34: Composition en acides gras (A), rapport acides gras insaturés/acides gras saturés (B), composition en stérols (C) et rapport ergostérol/squalène (D) des produits commerciaux**

Différentes études ont mis en évidence que les levures sont capables d'assimiler les lipides exogènes et que l'augmentation du degré d'insaturation et de la teneur en ergostérol des membranes sont corrélées à l'augmentation de tolérance à l'éthanol chez *S. cerevisiae* et certaines levures non-*Saccharomyces* (Agudo, 1992; Aguilera et al., 2006; Alexandre et al., 1994; Beaven et al., 1982; Beltran et al., 2008; Ghareib et al., 1988; Landolfo et al., 2010; Luparia et al., 2004; Mishra and Kaur, 1991; Mishra and Prasad, 1989; Šajbidor and Grego, 1992; Pina et al., 2004; Redón et al., 2009; Thomas et al., 1978; Torija et al., 2003; Walker-Caprioglio et al., 1990; You et al., 2003).

En se basant sur la concentration en acides gras totaux, la proportion en acides gras insaturés et la concentration en stérols totaux, 3 produits ont été sélectionnés :

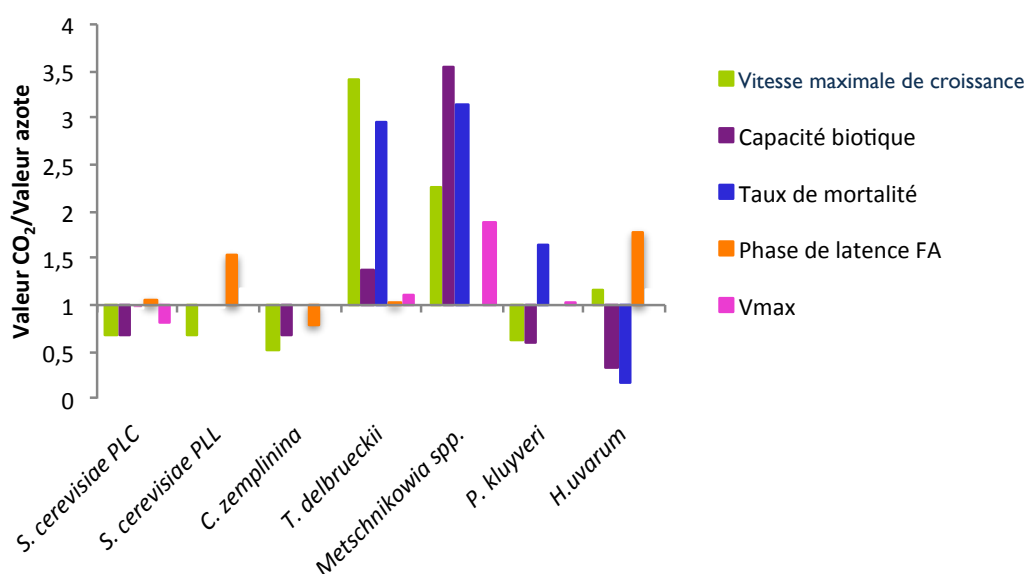
- Le produit C, le plus riche en acides gras
- Le produit A qui possède la plus forte proportion d'acides gras insaturés et la plus forte teneur en stérols (incluant le squalène)
- Le produit F qui possède le rapport ergostérol/squalène le plus élevé.

Les produits A, C et F seront utilisés pour la supplémentation du moût. Chaque produit est ajouté en début de fermentation, après dissolution dans une solution éthanol : eau (50 : 50 v/v) à 20 mg/L (quantité maximale autorisée par la réglementation).

### **1.3 Etude préliminaire sur l'impact du CO<sub>2</sub> (dioxyde de carbone) du N<sub>2</sub> (diazote)**

Au début de la fermentation alcoolique, la concentration en CO<sub>2</sub> dissout du moût augmente progressivement jusqu'à attendre une valeur de 1,2 g/L correspondant à la saturation, puis il y a dégagement. Afin d'étudier l'effet d'une saturation rapide en CO<sub>2</sub> du moût, avant le démarrage de la fermentation alcoolique sur le développement des levures, du CO<sub>2</sub> gazeux a été ajouté dans les fermenteurs, juste après l'inoculation, afin d'obtenir une concentration maximale en CO<sub>2</sub> dissout de 1,2 g/L. Rapidement, un équilibre s'est alors créé entre le liquide et l'espace de tête du fermenteur. La concentration en CO<sub>2</sub> dissout après stabilisation était comprise entre 1,05 et 1,1 g/L. La saturation du moût en CO<sub>2</sub> a également entraîné une diminution de la concentration en oxygène dissout pouvant affecter la croissance des levures. Dans nos conditions expérimentales, la concentration du moût en O<sub>2</sub> dissout a diminué de 6 mg/L à 2 mg/L. Afin de s'assurer que les effets observés sont bien dus à la présence de CO<sub>2</sub> et non à la diminution de la quantité d'oxygène disponible, des essais préliminaires ont été réalisés en remplaçant le CO<sub>2</sub> par du N<sub>2</sub>. Ce dernier a été ajouté dans les fermenteurs, après inoculation, jusqu'à obtenir une concentration en oxygène dissout de 2 mg/L.

Afin d'étudier plus précisément l'impact du CO<sub>2</sub> et du N<sub>2</sub> sur le développement et la capacité fermentaire des différentes espèces de non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae*, différents paramètres de croissance (vitesse maximale de croissance, capacité biotique, taux de mortalité) et de fermentation (phase de latence, vitesse maximale de dégagement de CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> dégagé en fin de fermentation) ont été calculés. Pour l'ensemble des espèces étudiées, la quantité de CO<sub>2</sub> dégagé en fin de fermentation est similaire en présence de CO<sub>2</sub> et de N<sub>2</sub>. Pour les autres paramètres, l'ensemble des résultats est présenté sur la figure 35. Pour chaque paramètre est présenté le rapport entre la valeur obtenue pour la modalité CO<sub>2</sub> et la modalité N<sub>2</sub>. Si, pour une espèce donnée, aucune différence significative ( $p < 0,05$ ) n'est observée entre les deux modalités pour un des paramètres, il n'apparaît pas sur la figure. Des variations au niveau de la durée de la phase de latence de fermentation sont observées chez *S. cerevisiae* (PLC et PLL), *C. zemplinina* et *H. uvarum*, et au niveau du Vmax chez *S. cerevisiae* PLC, *T. delbrueckii* et *Metschnikowia* spp.



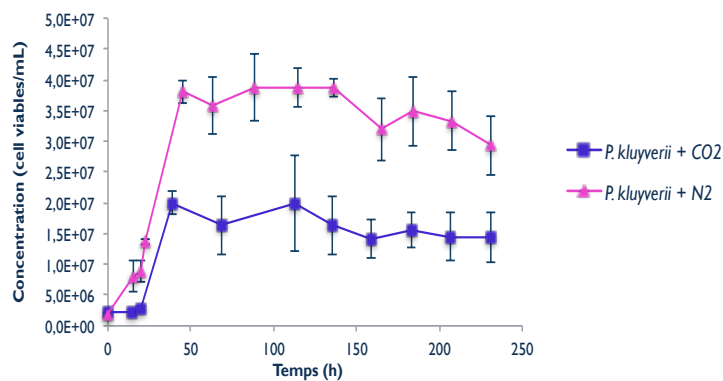
**Figure 35: Impact du CO<sub>2</sub> et du N<sub>2</sub> sur les différents paramètres de croissance et de fermentation. Présentation pour chaque espèce des paramètres et composés présentant une différence significative ( $p < 0,05$ ) lors de la comparaison des 2 modalités CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>.**

Pour chaque paramètre ou composé, le rapport entre la valeur moyenne obtenue pour la modalité CO<sub>2</sub> et celle obtenue pour la modalité N<sub>2</sub> est représenté.



Les fermentations réalisées avec les deux souches de *S. cerevisiae* ont permis la dégradation totale des sucres en présence de CO<sub>2</sub> et de N<sub>2</sub> (concentrations en sucres résiduels finales inférieures à 2 g/L).

En présence de CO<sub>2</sub>, une croissance plus faible des deux souches de *S. cerevisiae* est observée avec taux de croissance et une population maximale (ou capacité biotique) plus faible par rapport à la modalité en présence d'azote. Cela entraîne une augmentation de la durée de la phase de latence de fermentation et une diminution du Vmax. Concernant la cinétique de croissance des non-*Saccharomyces*, deux comportements se distinguent. D'une part, la croissance de *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* est stimulée en présence de CO<sub>2</sub> (augmentation du taux de croissance et de la population maximale). D'autre part, le CO<sub>2</sub> a un impact négatif sur la croissance de *C. zemplinina*, *H. uvarum* et *P. kluyveri*. Pour cette dernière, cet impact est particulièrement marqué avec une forte inhibition de la croissance en présence de CO<sub>2</sub> (figure 36).



**Figure 36: Cinétiques de croissance de *P. kluyveri* en présence de CO<sub>2</sub> et de N<sub>2</sub>**

En conclusion, le CO<sub>2</sub> et le N<sub>2</sub> n'ont donc pas le même impact sur les cinétiques de croissance et de fermentation. Les futures différences observées lors de l'addition de CO<sub>2</sub> par rapport au témoin (sans ajout de CO<sub>2</sub>) ne seront pas dues à la diminution de la concentration en oxygène dissout mais bien à une action spécifique du CO<sub>2</sub>.

## 2 Impact de la saturation en CO<sub>2</sub> et de la supplémentation du moût avec les produits commerciaux

L'objectif de cette partie est de sélectionner des facteurs abiotiques permettant de favoriser les levures présentant un intérêt en œnologie et inhiber les levures indésirables parmi levures non-*Saccharomyces*.

Deux facteurs ont été sélectionnés : la saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation et la supplémentation de 3 produits commerciaux ayant des compositions lipidiques différentes.

Dans un premier temps, des essais ont été réalisés sur des cultures pures puis les facteurs présentant un intérêt ont été conservés afin de les tester sur un mélange d'espèces avec des proportions recréant la population levurienne d'un moût.

Cinq espèces de non-*Saccharomyces* fréquemment isolées des moûts sont incluses dans cette étude : *H. uvarum*, *C. zemplinina* (espèces majoritaires des moûts), *T. delbrueckii*, *P. kluyveri* (espèces minoritaires) et *Metschnikowia* spp. (espèce retrouvée en quantité intermédiaire). Les deux premières espèces sont susceptibles de produire des composés indésirables contrairement aux trois autres pouvant impacter positivement la qualité du vin (voir chapitre 3, étude bibliographique). Deux souches de *S. cerevisiae*, une à phase de latence courte et une à phase de latence longue, sont également ajoutées au dispositif. La présence de *S. cerevisiae* dans le mélange est indispensable pour sécuriser la fermentation alcoolique.

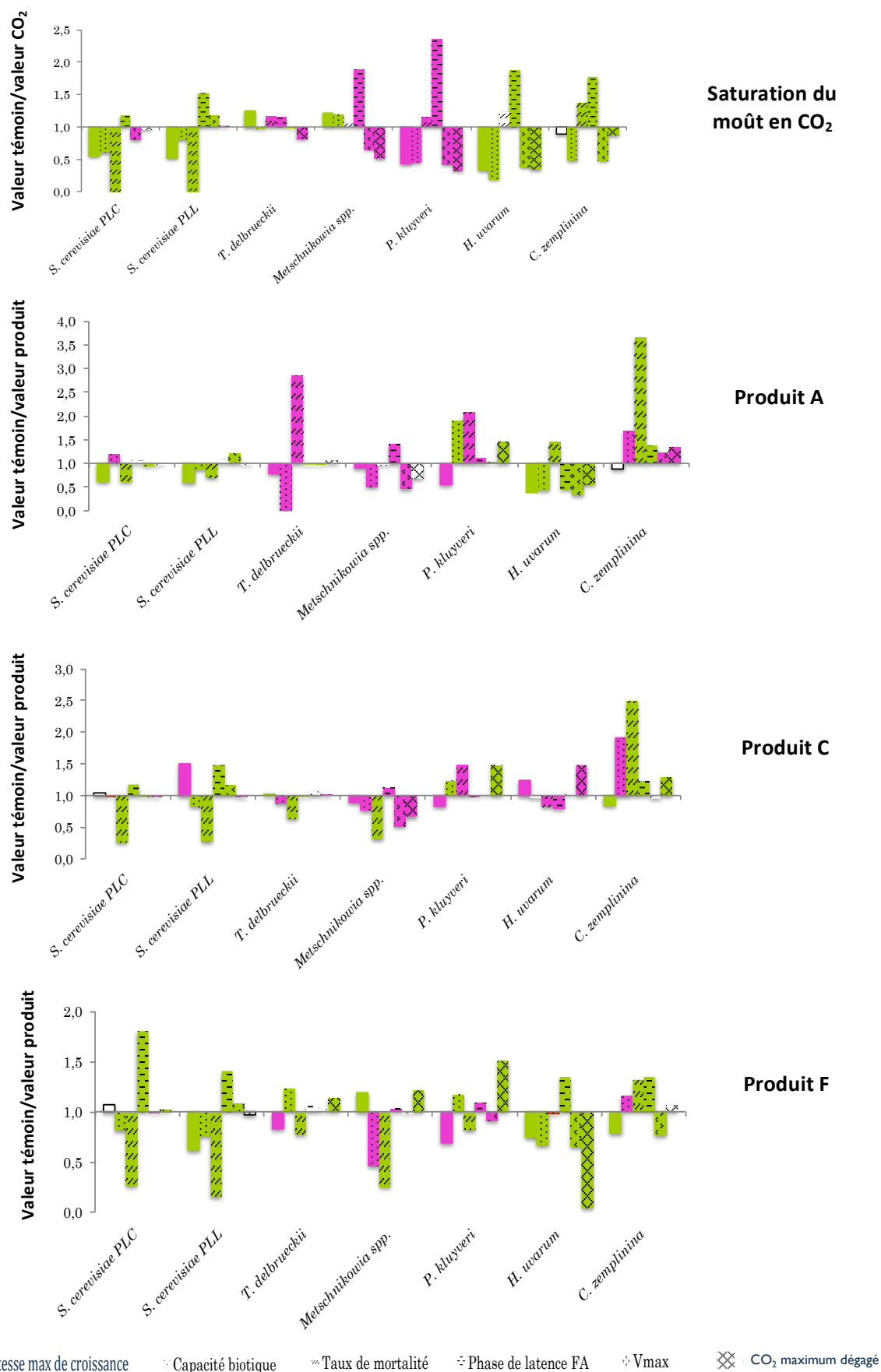
## 2.1 Cultures pures

### 2.1.1 Impact sur les cinétiques de croissance et de fermentation

Les fermentations ont été réalisées dans du Sauvignon Blanc et chaque souche a été inoculée à  $10^6$  cellules viables/mL. La saturation du moût en  $\text{CO}_2$  (1,2g/L) et la supplémentation avec les trois produits commerciaux A, C et F (à 20 g/hL) ont été testées indépendamment sur chaque souche et comparées à une modalité témoin (sans saturation ni supplémentation). Différents paramètres de croissance et de fermentation ont été calculés et sont présentés en annexe 2. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les différentes modalités.

Nous souhaitons, d'une part stimuler la croissance (augmenter la vitesse maximale de croissance, la capacité biotique et diminuer le taux de mortalité) et la fermentation alcoolique (diminuer la durée de la phase de latence, augmenter la  $V_{\text{max}}$  et la quantité de maximum de  $\text{CO}_2$  dégagé) des espèces *T. delbrueckii*, *P. kluyveri* et *Metschnikowia* spp. et, d'autre part, inhiber celles de *C. zemplinina* et *H. uvarum*. De plus, afin de faciliter le développement des levures non-*Saccharomyces* d'intérêt, il est souhaitable de ralentir la croissance de *S. cerevisiae* et donc le démarrage de la fermentation, sans toutefois diminuer sa capacité fermentaire (quantité de  $\text{CO}_2$  maximum dégagé). En effet, chez *S. cerevisiae*, nous avons en priorité vérifié que les fermentations alcooliques étaient achevées (sucres  $< 2$  g/L). Pour l'ensemble des espèces, les variations observées concernant la vitesse maximale de croissance, reflétant la capacité d'un espèce à se développer rapidement dans un milieu, ont été examinées dans un premier temps, suivie de l'évolution de la population maximale (ou capacité biotique) et du taux de mortalité.

La figure 37 présente, pour l'ensemble des souches et pour chaque paramètre, le rapport entre la modalité testée et la modalité témoin. Lorsque le diagramme apparaît en blanc, aucune différence significative n'est obtenue par rapport au témoin ( $\alpha = 0,05$ ). En vert, l'effet recherché est obtenu (stimulation de la croissance de *T. delbrueckii*, *P. kluyveri* et *Metschnikowia* spp., inhibition de *C. zemplinina* et *H. uvarum*, ralentissement de *S. cerevisiae* tout en sécurisant la fermentation alcoolique) et, en rose, l'effet inverse.



**Figure 37: Effet de la saturation en CO<sub>2</sub> et de la supplémentation du moût avec les produits commerciaux A, C et F sur les paramètres de croissance et de fermentation de différentes espèces de levure.**

Pour chaque paramètre ou composé, le rapport entre la valeur moyenne obtenue pour le facteur étudié (saturation en CO<sub>2</sub> ou supplémentation avec un produit commercial) et celle obtenue pour la modalité témoin (sans saturation ni supplémentation) est représenté. En vert, l'effet recherché est obtenu, en rose l'effet inverse. Si aucune différence significative ( $p < 0,05$ ) n'a été observée par rapport à la modalité témoin, le diagramme apparaît en blanc.

### 2.1.1.1 Impact de la saturation en CO<sub>2</sub>

Toutes les fermentations effectuées avec *S. cerevisiae* (PLC et PLL) ont été complètes. En présence de CO<sub>2</sub>, la croissance des deux souches est ralentie avec une diminution de la vitesse maximale de croissance et de la population maximale. Cela se traduit par l'augmentation de la durée de la phase de latence de fermentation pour l'ensemble des modalités et, également, de la durée de la fermentation (résultats non présentés).

Concernant la cinétique de croissance des non-*Saccharomyces*, deux comportements se distinguent. D'une part, la croissance de *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* est stimulée en présence de CO<sub>2</sub>, se traduisant par une augmentation de la vitesse maximale de croissance et/ou de la population maximale. D'autre part, le CO<sub>2</sub> a un impact négatif marqué sur la croissance de *P. kluyveri* et *H. uvarum*. En effet, une diminution de la vitesse maximale de croissance, de la population maximale et une augmentation du taux de mortalité sont observées chez *P. kluyveri* et *H. uvarum*. Chez *C. zemplinina*, la population maximale est impactée négativement par la présence de CO<sub>2</sub>, le taux de mortalité est également augmenté.

Pour l'ensemble des non-*Saccharomyces*, la fermentation alcoolique est fortement inhibée en présence de CO<sub>2</sub>. Néanmoins, cette inhibition de la fermentation n'implique pas toujours une inhibition de la croissance. En effet, la capacité fermentaire de *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* est bien inhibée en présence de CO<sub>2</sub> alors que leur croissance est stimulée.

Malgré son impact négatif sur la capacité fermentaire des non-*Saccharomyces* d'intérêt, la supplémentation du moût en CO<sub>2</sub> permet de ralentir la croissance de *S. cerevisiae* tout en assurant une fermentation alcoolique complète. De plus, il permet d'inhiber fortement le développement de *H. uvarum* et, dans une moindre mesure, celui de *C. zemplinina*. Parmi les espèces de non-*Saccharomyces* d'intérêt, les croissances de *T. delbrueckii* et de *Metschnikowia* spp. sont stimulées, seule celle de *P. kluyveri* est inhibée. La saturation du moût en CO<sub>2</sub> sera donc un paramètre retenu pour la suite des essais.

### 2.1.1.2 Impact de la supplémentation du moût avec les produits commerciaux A, C et F

En présence du produit A, la croissance de *S. cerevisiae* PLL est fortement ralentie avec une diminution du taux de croissance et de la population maximale. En revanche, le produit diminue le taux de mortalité de *S. cerevisiae* PLL et la vitesse de fermentation n'est pas impactée. Pour *S. cerevisiae* PLC, si la vitesse maximale de croissance est diminuée, la population maximale atteinte

est plus élevée que pour la modalité témoin. Ce produit permet également de diminuer le taux de mortalité de cette espèce.

Nous pouvons constater que le produit A a un effet négatif sur les espèces de levures non-*Saccharomyces* d'intérêt. En effet, une diminution de la vitesse maximale de croissance est observée à la fois pour *T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp. et pour *P. kluyveri* par rapport à la modalité témoin. De plus, la population maximale atteinte est plus faible pour *Metschnikowia* spp. et pour *T. delbrueckii*. Le taux de mortalité est également plus élevé pour cette dernière ainsi que pour *P. kluyveri*. La capacité fermentaire de *T. delbrueckii* et de *Metschnikowia* spp. n'est pas impactée malgré une augmentation de la durée de la phase de latence et une diminution du Vmax chez *Metschnikowia* spp. En revanche, ce produit améliore la capacité fermentaire de *P. kluyveri*.

En présence du produit A, la croissance de *H. uvarum* est fortement ralentie avec une diminution de la vitesse maximale de croissance et de la population maximale. Une augmentation du taux de mortalité est observée pour *H. uvarum* ainsi qu'une augmentation de la durée de la phase de latence et une diminution du Vmax au niveau de la cinétique fermentaire. L'effet sur le développement *C. zemplinina* est plus nuancé. En effet, sa vitesse maximale de croissance n'est pas impactée, en revanche, la population maximale, le taux de mortalité et la durée de la phase de latence de fermentation sont supérieurs par rapport à la modalité témoin. De plus, sa capacité fermentaire est également augmentée avec un Vmax plus élevé.

Si le produit A permet de ralentir la croissance de *H. uvarum*, ses effets négatifs sur les espèces de non-*Saccharomyces* d'intérêt sont également très marqués. Ce produit ne sera donc pas retenu pour la suite des essais

En présence du produit C, aucun effet significatif sur la croissance de *S. cerevisiae* PLC n'est observé. En revanche, si la capacité biotique de *S. cerevisiae* PLL est diminuée, son taux de croissance est stimulé en présence de ce produit.

Le produit C a également un effet négatif sur les espèces d'intérêt. En effet, si ce produit améliore la survie de *T. delbrueckii* et de *Metschnikowia* spp., une diminution de la population est observée pour ces deux espèces ainsi qu'une diminution de la vitesse maximale de croissance pour *Metschnikowia* spp. Là encore, seule la fermentation *Metschnikowia* spp. est impactée avec une augmentation de la durée de la phase de latence et une diminution du Vmax et de sa capacité fermentaire. Pour *P. kluyveri*, la vitesse maximale de croissance diminue. Si la population maximale augmente, le taux de mortalité est également plus important.

De plus, le produit C stimule la croissance et la fermentation de *H. uvarum* (vitesse maximale de croissance, population maximale, diminution du taux de mortalité...). Chez *C. zemplinina*, ce produit

permet de diminuer le taux de croissance et augmenter la mortalité, malgré une augmentation de la population maximale.

Ce produit ne permet donc pas de ralentir le développement de *S. cerevisiae* PLC et tend à stimuler celui de *S. cerevisiae* PLL et *H. uvarum*. De plus, la croissance des trois espèces d'intérêt (*T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp. et *P. kluyveri*) est fortement ralentie. Ce produit ne sera donc pas conservé pour la suite des essais.

Le produit F permet de ralentir la croissance de *S. cerevisiae* (PLC et PLL) avec une diminution de la vitesse maximale de croissance de Sc PLL et une diminution de la capacité biotique des deux souches. Si la capacité fermentaire n'est pas impactée, une diminution du taux de mortalité est observée, ainsi qu'une augmentation de la durée de la phase de latence de fermentation.

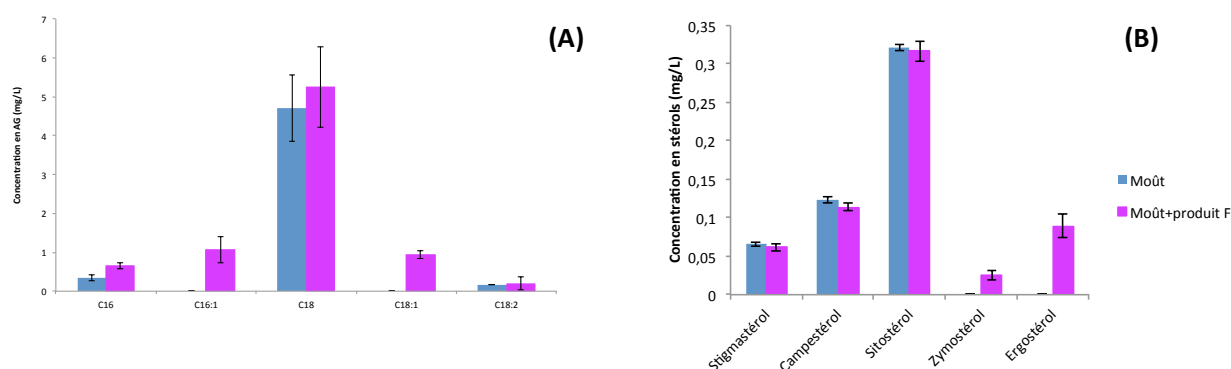
Ce produit permet également de ralentir la croissance de *H. uvarum* et *C. zemplinina* avec une diminution de la vitesse maximale de croissance et une augmentation de la durée de la phase de latence de fermentation. De plus, en présence de ce produit commercial, le taux de mortalité augmente pour ces deux espèces. Le produit F permet également de stimuler le démarrage de la croissance de *Metschnikowia* spp. avec une augmentation de la vitesse maximale de croissance. Néanmoins, la population maximale atteinte est plus faible par rapport à la modalité témoin. Une diminution du taux de mortalité est observée ainsi qu'une diminution de la capacité fermentaire de cette espèce. La vitesse maximale de croissance de *T. delbrueckii* et *P. kluyveri* est également ralentie en présence de ce produit mais il permet d'augmenter la population maximale et de diminuer le taux de mortalité pour ces deux espèces sans toutefois impacter leur capacité fermentaire.

Le produit F présente un intérêt car il permet de ralentir le développement de *S. cerevisiae* sans impacter sa capacité fermentaire et d'inhiber les espèces de non-*Saccharomyces* indésirables, *C. zemplinina* et *H. uvarum*. Il permet également de stimuler le démarrage de la croissance de *Metschnikowia* spp. et d'améliorer la survie de *T. delbrueckii* et *P. kluyveri*. Ce produit sera donc conservé pour les essais sur le mélange d'espèces.

L'analyse de la composition lipidique des cellules lors des fermentations en présence de ce produit et lors de la saturation du moût en CO<sub>2</sub>, autre facteur conservé pour la suite des essais, a été effectuée.

### 2.1.2 Impact de la saturation en CO<sub>2</sub> et de la supplémentation du produit F sur la composition lipidiques des cellules

Dans un premier temps, le dosage des acides gras et des stérols du moût, supplémenté et non supplémenté, avec le produit F été effectué (figure 38).



**Figure 38: Composition en acides gras (A) et en stérols (B) du moût avant fermentation, supplémenté ou non avec le produit F**

Acides gras : C16 = acide palmitique, C16 :1 = acide palmitoléique, C18 = acide stéarique, C18 :1 = acide oléique, C18 :2 = acide linoléique. Stérols : phytostérols = stigmatérol + campestérol + sitostérol, stérols de la levure = zymostérol + ergostérol

Le moût non supplémenté est constitué d'acides palmitique (C16), stéarique (C18) et linoléique (C18 : 2) ainsi que de phytostérols (stigmatérol, campestérol et sitostérol). L'ajout du produit commercial F permet de supplémenter le moût en acides gras insaturés (acides palmitoléique C16 :1 et oléique C18 :1), en zymostérol et ergostérol, et d'augmenter la quantité de C16 et C18 conformément à ce qui avait été observé lors de l'analyse de ce produit (paragraphe 1.2).

L'analyse de la composition en acides gras et en stérols des cellules a été réalisée sur les cellules issues des précultures (To = début FA) et sur les cellules en fin de fermentation alcoolique (pour chaque modalité : fin de FA Témoin, CO<sub>2</sub> et produit F).

A la fin de ce chapitre, l'analyse des corrélations entre la composition lipidique et les paramètres de croissance sera présentée.



### 2.1.2.1 Acides gras

#### 2.1.2.1.1 Evolution de la composition en acides gras au cours de la fermentation alcoolique (comparaison début FA et fin FA)

En comparant dans un premier temps les résultats obtenus en début et en fin de fermentation alcoolique pour la modalité témoin (tableau 17), une augmentation de la quantité totale d'acides gras est observée pour l'ensemble des souches sauf pour *H. uvarum*. Cette augmentation est très variable en fonction des espèces. *P. kluyveri* est caractérisée par la plus forte augmentation (x 4,25) contrairement à *C. zemplinina* (x 2,21).

Nous pouvons constater que la proportion de MCFA (acides gras à moyenne chaîne C6 à C12) reste stable pour l'ensemble des souches.

L'évolution de la composition en acides gras de *S. cerevisiae* (PLC et PLL), *Metschnikowia* spp. et de *P. kluyveri* est similaire. En effet, au cours de la fermentation, aucune variation n'est observée pour les PUFA (acides gras polyinsaturés C18:2). En fin de fermentation, la proportion des SFA (acides gras saturés C14, C16 et C18) diminue (de 7% pour *S. cerevisiae* à 42% pour *P. kluyveri*) au profit des MUFA (acides gras mono-insaturés C14:1, C16:1 et C18:1) entraînant ainsi une augmentation de la proportion des acides gras insaturés.

Pour l'espèce *C. zemplinina*, de la même façon que pour *S. cerevisiae*, *Metschnikowia* spp. et *P. kluyveri*, la proportion en SFA diminue au cours de la fermentation (-7%) et la quantité totale d'acides gras augmente. En revanche, la proportion de MUFA diminue d'environ 10% au cours de la fermentation contrairement à celle du C18:2. En effet, ce composé n'est pas détecté initialement et représente 10,2% des acides gras en fin de fermentation.

Contrairement aux autres espèces, *T. delbrueckii* et *H. uvarum* sont caractérisées par une augmentation de la proportion des SFA de 27% et 7,3% alors que la proportion en acides gras insaturés reste stable (*T. delbrueckii*) ou diminue (*H. uvarum*) au cours de la fermentation alcoolique, entraînant ainsi une diminution de la proportion des acides gras insaturés.

#### 2.1.2.1.2 Effet de la saturation en CO<sub>2</sub> et de la supplémentation du moût avec le produit F

En fin de fermentation alcoolique en présence de CO<sub>2</sub> ou du produit F, la quantité d'acides gras reste stable chez *S. cerevisiae* (PLC et PLL). En revanche, du fait de la diminution des MUFA et de l'augmentation des SFA, le rapport AGI/AGS diminue pour ces deux modalités.

Pour les espèces *C. zemplanina* et *P. kluyveri*, la quantité d'acides gras est plus faible en présence de CO<sub>2</sub> par rapport à la modalité témoin. Chez *C. zemplanina*, une forte diminution de la proportion d'acides gras insaturés est observée en présence du CO<sub>2</sub> (-74%) et du produit F (-29,3%). Cette diminution est observée chez *P. kluyveri* uniquement en présence du produit F.

La quantité totale d'acides gras augmente chez *T. delbrueckii* et *Metschnikowia* spp. en présence de CO<sub>2</sub> et diminue en présence du produit F. Une augmentation de la proportion d'acides gras insaturés est observée dans ces deux conditions pour *T. delbrueckii* du fait de la diminution des SFA et de l'augmentation des MUFA, contrairement à *Metschnikowia* spp.

**Tableau 17: Quantité d'acides gras par mg de cellule et proportions (%) des différentes familles en fonction des conditions de fermentation**

		Quantité totale d'acides gras (µg/mg poids sec)	MCFA (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)	AGI/AGS
<i>S. cerevisiae</i> PLC	Début FA	1,9 <sup>b</sup> ± 0,6	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	49,0 <sup>b</sup> ± 2,7	51,0 <sup>b</sup> ± 4,3	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	1,05 <sup>b</sup> ± 0,17
	Fin FA Témoin	4,8 <sup>a</sup> ± 0,5	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	40,0 <sup>c</sup> ± 0,8	59,3 <sup>a</sup> ± 1,0	0,6 <sup>a</sup> ± 1,1	1,50 <sup>a</sup> ± 0,05
	Fin FA CO <sub>2</sub>	4,3 <sup>a</sup> ± 0,6	4,2 <sup>a</sup> ± 4,1	55,7 <sup>ab</sup> ± 3,3	40,1 <sup>c</sup> ± 1,1	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	0,67 <sup>c</sup> ± 0,03
	Fin FA Produit F	3,3 <sup>ab</sup> ± 0,8	1,7 <sup>a</sup> ± 1,2	61,2 <sup>a</sup> ± 6,5	31,1 <sup>d</sup> ± 3,6	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	0,45 <sup>d</sup> ± 0,08
<i>S. cerevisiae</i> PLL	Début FA	4,0 <sup>b</sup> ± 0,9	1,4 <sup>a</sup> ± 1,4	53,2 <sup>b</sup> ± 1,9	42,4 <sup>b</sup> ± 0,5	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	0,8 <sup>b</sup> ± 0,01
	Fin FA Témoin	6,7 <sup>a</sup> ± 0,3	1,5 <sup>a</sup> ± 1,6	40,6 <sup>c</sup> ± 2,0	57,8 <sup>a</sup> ± 1,2	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	1,37 <sup>a</sup> ± 0,03
	Fin FA CO <sub>2</sub>	6,8 <sup>a</sup> ± 0,4	1,1 <sup>a</sup> ± 0,7	59,7 <sup>ab</sup> ± 1,4	37,5 <sup>c</sup> ± 0,7	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	0,60 <sup>c</sup> ± 0,02
	Fin FA Produit F	5,4 <sup>ab</sup> ± 0,3	1,1 <sup>a</sup> ± 1,2	62,7 <sup>a</sup> ± 3,1	29,7 <sup>d</sup> ± 0,5	1,6 <sup>a</sup> ± 1,5	0,46 <sup>d</sup> ± 0,04
<i>C. zemplanina</i>	Début FA	8,2 <sup>c</sup> ± 2,1	0,3 <sup>b</sup> ± 0,6	47,8 <sup>c</sup> ± 0,3	51,9 <sup>a</sup> ± 0,5	0,0 <sup>b</sup> ± 0,0	1,08 <sup>b</sup> ± 0,02
	Fin FA Témoin	18,2 <sup>a</sup> ± 0,6	0,4 <sup>b</sup> ± 0,3	40,1 <sup>d</sup> ± 0,7	49,3 <sup>b</sup> ± 0,7	10,2 <sup>a</sup> ± 0,3	1,36 <sup>a</sup> ± 0,05
	Fin FA CO <sub>2</sub>	4,2 <sup>d</sup> ± 0,9	1,3 <sup>a</sup> ± 0,6	62,9 <sup>a</sup> ± 5,8	22,7 <sup>c</sup> ± 7,6	13,0 <sup>a</sup> ± 2,0	0,35 <sup>d</sup> ± 0,17
	Fin FA Produit F	15,2 <sup>b</sup> ± 1,3	0,7 <sup>b</sup> ± 0,1	50,4 <sup>b</sup> ± 1,7	48,9 <sup>b</sup> ± 1,7	0,0 <sup>b</sup> ± 0,0	0,96 <sup>c</sup> ± 0,07
<i>T. delbrueckii</i>	Début FA	3,4 <sup>c</sup> ± 1,8	5,8 <sup>a</sup> ± 5,7	41,1 <sup>b</sup> ± 1,4	51,2 <sup>a</sup> ± 7,7	1,9 <sup>a</sup> ± 3,3	1,15 <sup>a</sup> ± 0,25
	Fin FA Témoin	14,0 <sup>b</sup> ± 2,1	1,0 <sup>a</sup> ± 0,8	68,1 <sup>a</sup> ± 3,9	30,7 <sup>b</sup> ± 2,2	0,2 <sup>a</sup> ± 0,4	0,45 <sup>b</sup> ± 0,05
	Fin FA CO <sub>2</sub>	22,0 <sup>a</sup> ± 1,6	1,7 <sup>a</sup> ± 1,4	41,7 <sup>b</sup> ± 1,3	56,6 <sup>a</sup> ± 1,6	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	1,31 <sup>a</sup> ± 0,09
	Fin FA Produit F	3,5 <sup>c</sup> ± 2,6	3,2 <sup>a</sup> ± 1,0	29,4 <sup>c</sup> ± 6,8	66,4 <sup>a</sup> ± 13,8	1,1 <sup>a</sup> ± 1,8	1,34 <sup>a</sup> ± 1,09
<i>Metschnikowia</i> spp.	Début FA	2,4 <sup>c</sup> ± 0,8	5,6 <sup>a</sup> ± 5,3	73,6 <sup>a</sup> ± 7,8	16,2 <sup>c</sup> ± 3,3	4,6 <sup>a</sup> ± 4,7	0,26 <sup>c</sup> ± 0,03
	Fin FA Témoin	9,2 <sup>b</sup> ± 0,8	0,3 <sup>a</sup> ± 0,2	40,7 <sup>b</sup> ± 0,8	51,0 <sup>a</sup> ± 1,3	4,0 <sup>a</sup> ± 0,3	1,44 <sup>a</sup> ± 0,08
	Fin FA CO <sub>2</sub>	15,9 <sup>a</sup> ± 0,8	0,7 <sup>a</sup> ± 0,2	73,6 <sup>a</sup> ± 7,6	23,9 <sup>b</sup> ± 4,9	3,8 <sup>a</sup> ± 1,1	0,35 <sup>c</sup> ± 0,12
	Fin FA Produit F	4,6 <sup>c</sup> ± 1,1	0,6 <sup>a</sup> ± 1,0	60,6 <sup>b</sup> ± 4,8	33,7 <sup>b</sup> ± 0,6	5,1 <sup>a</sup> ± 4,6	0,64 <sup>b</sup> ± 0,11
<i>P. kluyveri</i>	Début FA	2,7 <sup>ab</sup> ± 1,1	0,9 <sup>a</sup> ± 1,5	74,9 <sup>a</sup> ± 7,0	18,2 <sup>c</sup> ± 0,5	6,0 <sup>a</sup> ± 5,4	0,32 <sup>b</sup> ± 0,10
	Fin FA Témoin	11,5 <sup>a</sup> ± 0,5	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	32,5 <sup>b</sup> ± 6,9	50,9 <sup>a</sup> ± 1,5	6,6 <sup>a</sup> ± 5,8	2,17 <sup>a</sup> ± 0,65
	Fin FA CO <sub>2</sub>	1,2 <sup>b</sup> ± 0,7	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	32,7 <sup>b</sup> ± 1,0	50,9 <sup>a</sup> ± 1,5	6,4 <sup>a</sup> ± 0,5	2,06 <sup>a</sup> ± 0,10
	Fin FA Produit F	11,9 <sup>a</sup> ± 2,4	1,8 <sup>a</sup> ± 1,5	69,1 <sup>a</sup> ± 8,1	26,0 <sup>b</sup> ± 4,7	3,1 <sup>a</sup> ± 1,9	0,42 <sup>b</sup> ± 0,13
<i>H. uvarum</i>	Début FA	2,0 <sup>a</sup> ± 0,8	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	48,3 <sup>b</sup> ± 3,6	51,7 <sup>b</sup> ± 2,6	0,0 <sup>b</sup> ± 0,0	1,19 <sup>a</sup> ± 0,42
	Fin FA Témoin	2,6 <sup>a</sup> ± 1,9	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	55,6 <sup>a</sup> ± 6,8	44,4 <sup>c</sup> ± 3,7	0,0 <sup>b</sup> ± 0,0	0,79 <sup>b</sup> ± 0,23
	Fin FA CO <sub>2</sub>	2,0 <sup>a</sup> ± 1,2	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	56,4 <sup>a</sup> ± 4,1	40,9 <sup>c</sup> ± 4,7	2,7 <sup>a</sup> ± 4,0	0,88 <sup>b</sup> ± 0,18
	Fin FA Produit F	2,2 <sup>a</sup> ± 1,0	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0	42,4 <sup>b</sup> ± 4,1	57,6 <sup>a</sup> ± 3,1	0,0 <sup>b</sup> ± 0,0	1,35 <sup>a</sup> ± 0,24

MCFA : Acides gras à moyenne chaîne (C8 à C12) ; SFA : Acides gras saturés (C14, C16 et C18) ; MUFA : acides gras mono-insaturés (C14:1, C16:1 et C18:1) ; PUFA : Polyunsaturated fatty acids (C18:2) ; AGI/AGS : (MUFA+PUFA)/(MCFA+SFA) ; a,b,c,... : groupes issus du test de Kruskal-Wallis, p<0,05 après comparaison des modalités début FA (pré-cultures)/Témoin (moût non supplémenté non saturé)/CO<sub>2</sub> (moût saturé en CO<sub>2</sub>)/Produit F (moût supplémenté avec le produit F) pour chaque famille d'acide gras et chaque espèce

### 2.1.2.2 Stérols

Au cours de la fermentation alcoolique, la quantité de stérols (hors squalène) augmente chez *S. cerevisiae* (PLC et PLL), *C. zemplinina* et *Metschnikowia* spp. et diminue chez *T. delbrueckii*, *P. kluyveri* et *H. uvarum* (tableau 18). En présence du CO<sub>2</sub> ou du produit F, la quantité de stérols diminue chez *S. cerevisiae*, *C. zemplinina* et *H. uvarum* par rapport à la modalité témoin. Chez *T. delbrueckii* et *P. kluyveri*, cette diminution n'est observée uniquement en présence du CO<sub>2</sub>, la présence du produit F entraînant une augmentation de la quantité de stérols par rapport à la modalité témoin. Enfin, chez *Metschnikowia* spp. la quantité finale de stérols augmente en présence de CO<sub>2</sub> et du produit F.

Pour l'ensemble des espèces et des modalités, deux composés sont principalement détectés : le squalène, précurseur des stérols lors de la biosynthèse *de novo*, et l'ergostérol.

**Tableau 18: Composition en stérols des différentes espèces (quantité totale de stérol et pourcentage de chaque stérol) et proportion en squalène**

		Quantité stérols totale (µg/g poids sec)	Squalène (%)	Zymostérol (%)	Ergostérol (%)	Lanostérol (%)	Sitostérol (%)	Campestérol (%)	Stigmastérol (%)	Phytostérols (%)
<i>S. cerevisiae</i> PLC	Début FA	266,2 <sup>b</sup> ± 37,5	22,3 <sup>c</sup> ± 1,5	5,7 <sup>a</sup> ± 2,5	54,7 <sup>a</sup> ± 5,5	11,0 <sup>b</sup> ± 0,0	7,3 <sup>a</sup> ± 1,5	2,0 <sup>a</sup> ± 2,0	ND	5,3 <sup>b</sup> ± 1,0
	Fin FA Témoin	368,4 <sup>a</sup> ± 20,2	36,3 <sup>a</sup> ± 1,5	4,0 <sup>b</sup> ± 4,4	33,3 <sup>b</sup> ± 5,7	20,0 <sup>a</sup> ± 3,6	3,7 <sup>b</sup> ± 1,5	1,3 <sup>a</sup> ± 1,3		9,0 <sup>a</sup> ± 3,2
	Fin FA CO <sub>2</sub>	230,1 <sup>b</sup> ± 25,2	16,0 <sup>c</sup> ± 1,5	4,7 <sup>a</sup> ± 3,2	54,3 <sup>a</sup> ± 5,8	18,0 <sup>a</sup> ± 15,0	2,7 <sup>b</sup> ± 1,5	0,7 <sup>a</sup> ± 0,7		3,4 <sup>b</sup> ± 2,6
	Fin FA Produit F	222,6 <sup>d</sup> ± 49,2	27,0 <sup>d</sup> ± 3,5	6,0 <sup>a</sup> ± 5,7	53,3 <sup>a</sup> ± 8,7	9,3 <sup>d</sup> ± 8,1	3,3 <sup>d</sup> ± 3,5	0,0 <sup>a</sup> ± 0,0		3,3 <sup>b</sup> ± 5,0
<i>S. cerevisiae</i> PLL	Début FA	291,2 <sup>b</sup> ± 50,0	14,3 <sup>c</sup> ± 0,6	6,0 <sup>a</sup> ± 1,5	60,0 <sup>a</sup> ± 3,0	12,0 <sup>b</sup> ± 1,0	7,0 <sup>a</sup> ± 0,6	0,7 <sup>a</sup> ± 0,7	ND	5,4 <sup>b</sup> ± 1,7
	Fin FA Témoin	405,9 <sup>a</sup> ± 42,7	40,0 <sup>a</sup> ± 4,2	6,7 <sup>a</sup> ± 2,0	41,0 <sup>b</sup> ± 2,0	19,0 <sup>a</sup> ± 6,5	4,3 <sup>b</sup> ± 4,2	1,3 <sup>a</sup> ± 0,3		8,6 <sup>a</sup> ± 2,7
	Fin FA CO <sub>2</sub>	189,1 <sup>c</sup> ± 18,6	15,7 <sup>c</sup> ± 1,0	5,0 <sup>a</sup> ± 2,0	60,0 <sup>a</sup> ± 3,0	17,7 <sup>a</sup> ± 6,5	2,0 <sup>b</sup> ± 1,0	0,7 <sup>a</sup> ± 0,7		2,7 <sup>b</sup> ± 1,5
	Fin FA Produit F	188,6 <sup>c</sup> ± 23,2	22,0 <sup>b</sup> ± 1,5	8,0 <sup>a</sup> ± 4,0	63,0 <sup>a</sup> ± 6,0	5,7 <sup>c</sup> ± 6,7	3,3 <sup>b</sup> ± 1,5	ND		3,3 <sup>b</sup> ± 1,5
<i>C. zemplinina</i>	Début FA	382,7 <sup>c</sup> ± 61,0	27,0 <sup>b</sup> ± 3,1	6,7 <sup>a</sup> ± 4,7	62,3 <sup>b</sup> ± 5,9	9,3 <sup>a</sup> ± 4,2	2,7 <sup>b</sup> ± 3,1	ND	ND	2,7 <sup>b</sup> ± 2,0
	Fin FA Témoin	1143,1 <sup>a</sup> ± 47,5	7,0 <sup>d</sup> ± 1,5	1,7 <sup>d</sup> ± 1,5	75,0 <sup>a</sup> ± 1,2	5,3 <sup>b</sup> ± 1,2	8,7 <sup>a</sup> ± 1,5			8,7 <sup>a</sup> ± 3,0
	Fin FA CO <sub>2</sub>	100,9 <sup>d</sup> ± 30,8	86,3 <sup>a</sup> ± 0,0	ND	13,7 <sup>c</sup> ± 1,5	ND	ND			ND
	Fin FA Produit F	1034,2 <sup>b</sup> ± 20,9	13,7 <sup>c</sup> ± 2,0	7,3 <sup>a</sup> ± 2,5	53,0 <sup>b</sup> ± 3,6	16,7 <sup>a</sup> ± 3,1	10,0 <sup>a</sup> ± 2,0			10 <sup>a</sup> ± 1,0
<i>T. delbrueckii</i>	Début FA	348,8 <sup>b</sup> ± 28,3	6,7 <sup>d</sup> ± 2,5	9,7 <sup>a</sup> ± 5,5	81,3 <sup>a</sup> ± 29,5	ND	2,3 <sup>a</sup> ± 2,5	ND	ND	2,3 <sup>c</sup> ± 1,5
	Fin FA Témoin	236,5 <sup>c</sup> ± 24,6	70,7 <sup>b</sup> ± 1,3	1,3 <sup>b</sup> ± 0,6	23,0 <sup>c</sup> ± 3,0	0,3 <sup>b</sup> ± 0,6	ND	5,0 <sup>a</sup> ± 5,0		5,0 <sup>a</sup> ± 1,2
	Fin FA CO <sub>2</sub>	120,1 <sup>a</sup> ± 10,0	80,0 <sup>a</sup> ± 2,0	3,0 <sup>b</sup> ± 1,0	8,7 <sup>d</sup> ± 0,5	0,7 <sup>d</sup> ± 0,6	1,0 <sup>a</sup> ± 0,0	4,3 <sup>a</sup> ± 6,3		5,3 <sup>a</sup> ± 1,0
	Fin FA Produit F	1162,7 <sup>a</sup> ± 18,7	33,0 <sup>c</sup> ± 1,5	2,0 <sup>b</sup> ± 1,0	57,0 <sup>b</sup> ± 7,0	4,3 <sup>a</sup> ± 2,5	0,3 <sup>a</sup> ± 0,2	1,7 <sup>a</sup> ± 2,7		2,0 <sup>b</sup> ± 1,7
<i>Metschnikowia</i> spp.	Début FA	7,2 <sup>d</sup> ± 1,9	39,7 <sup>a</sup> ± 0,0	ND	60,3 <sup>b</sup> ± 7,5	ND	ND	ND	ND	ND
	Fin FA Témoin	12,8 <sup>c</sup> ± 1,8	3,3 <sup>b</sup> ± 1,0	6,7 <sup>b</sup> ± 4,5	90,0 <sup>a</sup> ± 3,0	ND	1,0 <sup>b</sup> ± 1,0	ND		1,0 <sup>b</sup> ± 1,0
	Fin FA CO <sub>2</sub>	43,3 <sup>a</sup> ± 0,8	6,7 <sup>b</sup> ± 0,0	ND	94,3 <sup>a</sup> ± 6,5	ND	ND	ND		ND
	Fin FA Produit F	35,1 <sup>d</sup> ± 4,8	24,0 <sup>a</sup> ± 0,6	9,7 <sup>a</sup> ± 1,5	52,0 <sup>d</sup> ± 2,0	7,3 <sup>a</sup> ± 2,5	6,7 <sup>a</sup> ± 0,6	ND		6,7 <sup>a</sup> ± 0,0
<i>P. kluyveri</i>	Début FA	165,9 <sup>b</sup> ± 22,6	ND	ND	100,0 <sup>a</sup> ± 14,0	ND	ND	ND	ND	ND
	Fin FA Témoin	143,4 <sup>c</sup> ± 3,0	13,0 <sup>b</sup> ± 1,0	ND	79,0 <sup>ab</sup> ± 3,0	ND	8,0 <sup>a</sup> ± 1,0	ND		8,0 <sup>a</sup> ± 0,6
	Fin FA CO <sub>2</sub>	130,5 <sup>d</sup> ± 2,1	25,7 <sup>a</sup> ± 0,0	ND	69,0 <sup>b</sup> ± 2,0	ND	5,0 <sup>a</sup> ± 0,0	ND		5,0 <sup>b</sup> ± 0,6
	Fin FA Produit F	256,5 <sup>a</sup> ± 12,8	22,3 <sup>a</sup> ± 3,0	8,0 <sup>a</sup> ± 1,0	51,0 <sup>c</sup> ± 6,0	14,0 <sup>a</sup> ± 6,0	5,0 <sup>d</sup> ± 3,0	ND		5,0 <sup>b</sup> ± 2,0
<i>H. uvarum</i>	Début FA	670,1 <sup>a</sup> ± 79,9	4,0 <sup>b</sup> ± 0,6	8,3 <sup>b</sup> ± 1,5	85,0 <sup>a</sup> ± 6,0	1,0 <sup>a</sup> ± 1,0	1,3 <sup>a</sup> ± 0,6	ND	1,0 <sup>a</sup> ± 1,0	2,3 <sup>a</sup> ± 0,6
	Fin FA Témoin	440,6 <sup>b</sup> ± 18,8	20,3 <sup>a</sup> ± 1,0	4,0 <sup>c</sup> ± 2,0	74,0 <sup>a</sup> ± 7,0	ND	2,0 <sup>a</sup> ± 1,0		1,0 <sup>a</sup> ± 1,0	2,7 <sup>a</sup> ± 1,2
	Fin FA CO <sub>2</sub>	303,1 <sup>c</sup> ± 12,2	2,0 <sup>b</sup> ± 1,0	19,0 <sup>a</sup> ± 4,0	76,7 <sup>a</sup> ± 8,5	0,3 <sup>a</sup> ± 0,6	1,0 <sup>a</sup> ± 1,0		0,3 <sup>a</sup> ± 0,3	1,3 <sup>a</sup> ± 1,2
	Fin FA Produit F	312,1 <sup>c</sup> ± 36,0	1,0 <sup>b</sup> ± 0,5	16,0 <sup>a</sup> ± 1,0	80,0 <sup>a</sup> ± 2,0	0,3 <sup>a</sup> ± 0,6	1,3 <sup>a</sup> ± 1,5		1,0 <sup>a</sup> ± 1,0	2,3 <sup>a</sup> ± 1,5

ND : non détecté

La somme des stérols n'inclut pas le squalène

Phytostérols = sitostérol + campestérol + stigmastérol

a,b,c,... : groupes issus du test de Kruskal-Wallis, p<0,05 après comparaison des modalités début FA/Témoin/CO<sub>2</sub>/Produit F pour chaque stérol et chaque espèce.

#### 2.1.2.2.1 Evolution de la proportion en squalène et ergostérol

*S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *P. kluyveri* et *H. uvarum* sont caractérisées par une augmentation importante de la proportion du squalène au cours de la fermentation dans le cas de la modalité témoin. *T. delbrueckii* devient alors l'espèce la plus riche en squalène (70%). En revanche, chez les deux autres espèces *C. zemplinina* et *Metschnikowia* spp., le squalène représentant initialement 30 à 40% des stérols ne constitue plus que 7 et 3,3% des membranes respectives.

En présence de CO<sub>2</sub> et du produit F, la proportion de squalène diminue chez *S. cerevisiae* (-11-25%) et *H. uvarum* (-20%) et augmente chez *C. zemplinina* (+ 80% en présence de CO<sub>2</sub> et + 7% avec le produit F) et *P. kluyveri* (+9-12%) par rapport à la modalité témoin. La présence de CO<sub>2</sub> n'affecte pas la composition en squalène de *Metschnikowia* spp., en revanche, en présence du produit commercial la proportion en squalène en fin de fermentation est plus élevée que pour la modalité témoin. En fin de fermentation, la proportion de squalène augmente de 10% par rapport à la modalité témoin en présence de CO<sub>2</sub> chez *T. delbrueckii* et diminue en présence du produit F.

Chez *H. uvarum*, la proportion en ergostérol reste stable au cours de la fermentation pour l'ensemble des modalités testées. L'ergostérol est le seul stérol détecté chez *P. kluyveri* en début de fermentation. *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* et *P. kluyveri* sont caractérisées par une diminution de la proportion d'ergostérol au cours de la fermentation dans le cas de la modalité témoin. Pour les deux autres espèces *C. zemplinina* et *Metschnikowia* spp., l'ergostérol représentant initialement 60% des stérols présents augmente de 15% (*C. zemplinina*) et 30% (*Metschnikowia* spp.).

La saturation du milieu en CO<sub>2</sub> impacte la composition en ergostérol en fin de fermentation uniquement chez *C. zemplinina* et *T. delbrueckii* pour lesquelles une diminution est observée par rapport à la modalité témoin. Lorsque le moût est supplémenté avec le produit F, une diminution de la proportion d'ergostérol est observée pour *C. zemplinina*, *Metschnikowia* spp. et *P. kluyveri*. En revanche, avec ce produit, la proportion d'ergostérol augmente chez *T. delbrueckii*.

#### 2.1.2.2.2 Evolution de la proportion en zymostérol et lanostérol

Le lanostérol et le zymostérol représentent une part moins importante des stérols membranaires. Ce dernier constitue généralement moins de 10% des stérols sauf lorsque *H. uvarum* est cultivée en présence de CO<sub>2</sub> ou du produit commercial où il atteint des valeurs comprises entre 16 et 19%. Chez *S. cerevisiae*, le lanostérol est présent à environ 10% en début de fermentation alcoolique et représente jusqu'à 20% des stérols en fin de fermentation (modalités

témoin et CO<sub>2</sub>). En présence du produit F, la proportion de lanostérol retrouvée en fin de fermentation diminue fortement. Chez les levures non-*Saccharomyces* étudiées, le lanostérol détecté en début de fermentation est inférieur à 10%. Cette proportion augmente lorsque les cellules sont cultivées en présence du produit F particulièrement chez *P. kluyveri* (+14%).

#### 2.1.2.2.3 Evolution de la proportion en phytostérols

Parmi les phytostérols présents dans le moût, le stigmastérol n'est détecté que pour l'espèce *H. uvarum* et le campestérol uniquement chez *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Chez cette dernière, il n'est détecté qu'en fin de fermentation mais constitue le phytostérol majoritairement retrouvé (jusqu'à 6,3% des stérols totaux en présence de CO<sub>2</sub>). Chez *C. zemplinina*, *Metschnikowia* spp. et *P. kluyveri* le phytostérol exclusivement retrouvé est le sitostérol, majoritaire dans les moûts. La proportion en stérols végétaux au cours de la fermentation varie en fonction des espèces. En début de fermentation, chez *Metschnikowia* spp. et *P. kluyveri* aucun phytostérol n'est détecté alors qu'ils représentent environ 2,5% des stérols chez *C. zemplinina*, *T. delbrueckii* et l'espèce *H. uvarum* et 5% chez *S. cerevisiae*. La proportion en phytostérols augmente chez toutes les espèces au cours de la fermentation, particulièrement chez *S. cerevisiae* où ils représentent alors près de 10% des stérols totaux.

En présence de CO<sub>2</sub> ou du produit commercial, la proportion en phytostérols *H. uvarum* reste stable par rapport au début de fermentation et à la modalité témoin. En revanche, chez *T. delbrueckii*, la proportion en phytostérols diminue de 2% par rapport à la modalité témoin lorsque le moût est supplémenté avec le produit F, et reste stable en présence de CO<sub>2</sub>. Chez *C. zemplinina* et *Metschnikowia* spp., une augmentation de ces stérols est également observée en présence du produit F alors que leur proportion diminue en présence de CO<sub>2</sub>. Enfin, chez *S. cerevisiae* et *P. kluyveri*, la proportion en phytostérols en fin de fermentation est plus faible en présence de CO<sub>2</sub> et du produit F.

#### 2.1.2.3 Corrélations entre la composition en lipides et les paramètres de croissance et de fermentation

L'analyse des corrélations entre les paramètres de croissance (vitesse maximale de croissance, capacité biotique et taux de mortalité) et de fermentation (phase de latence, V<sub>max</sub>, quantité maximale de CO<sub>2</sub> dégagée) d'une part et la composition lipidique d'autre part a permis de mettre

en évidence des corrélations significatives grâce à l'utilisation du coefficient de Spearman au seuil de 5% (tableau 19).

**Tableau 19: Corrélations entre les paramètres de croissance et de fermentation et la composition lipidique**

	SFA (%)	MUFA (%)	AGI/AGS	Quantité stérols (µg/mg poids sec)	Squalène (%)	Ergostérol (%)	Zymostérol (%)	Lanostérol (%)	Phytostérols (%)
<i>S. cerevisiae</i> (PLC et PLL) - Capacité biotique		0,94	0,97						-0,95
<i>S. cerevisiae</i> (PLC et PLL) - Taux de mortalité					0,74				
<i>T. delbrueckii</i> – Taux de mortalité									0,99
<i>T. delbrueckii</i> - CO <sub>2</sub> max						0,98			
<i>Metschnikowia</i> spp. – Taux de mortalité	0,83								
<i>Metschnikowia</i> spp. – CO <sub>2</sub> max	-0,83								
<i>P. kluyveri</i> – Vitesse maximale de croissance					-0,99				
<i>C. zemplinina</i> – Taux de mortalité							0,88	0,79	
<i>C. zemplinina</i> - CO <sub>2</sub> max				0,87			-0,88	-0,83	
<i>H. uvarum</i> - CO <sub>2</sub> max				0,79					

MCFA : Acides gras à moyenne chaîne (C8 à C12) ; SFA : Acides gras saturés (C14, C16 et C18) ; MUFA : acides gras mono-insaturés (C14 :1, C16 :1 et C18 :1) ; AGI/AGS : (MUFA+PUFA)/(MCFA+SFA)

Calcul des corrélations grâce au coefficient rho de Spearman. Seules les corrélations significatives sont représentées (p<0,05)

Les résultats montrent que chez *S. cerevisiae*, la capacité biotique est corrélée positivement à la proportion de MUFA et au rapport AGI/AGS, et négativement à la proportion de phytostérols. Le taux de mortalité est corrélé positivement à la proportion de squalène. La diminution de la capacité biotique, observée en présence de CO<sub>2</sub> et du produit F, peut donc s'expliquer par la diminution de la proportion des MUFA et du rapport AGI/AGS et par une augmentation de la proportion de phytostérols par rapport à la modalité témoin. De la même façon, la diminution du taux de mortalité pour ces deux facteurs est liée à la diminution de la proportion en squalène.

Chez *T. delbrueckii* en présence du produit F, la diminution du taux de mortalité est corrélée à la diminution de la proportion en phytostérols et l'augmentation de la capacité fermentaire à l'augmentation de la proportion d'ergostérol.

Une augmentation de la mortalité est observée en présence de CO<sub>2</sub> pour *Metschnikowia* spp. alors qu'elle diminue en présence du produit F. Ces variations sont corrélées positivement avec la proportion de SFA contrairement au CO<sub>2</sub> max chez la même espèce.

Chez *P. kluyveri*, le taux de croissance, qui diminue fortement en présence de CO<sub>2</sub> et du produit F, est corrélé négativement à la proportion de squalène.

Enfin, le taux de mortalité de *C. zemplinina* est corrélé négativement aux proportions de zymostérol et lanostérol contrairement au CO<sub>2</sub> max. La capacité fermentaire est également corrélée à la quantité de stérols chez cette espèce et chez *H. uvarum*.

### 2.1.3 Conclusion des essais réalisés en culture pure

A l'issue de ces essais, deux facteurs ont été sélectionnés en fonction de leur impact sur le développement des espèces de levures non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae* : la saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique et la supplémentation du moût avec le produit commercial F. Ces deux facteurs permettent de ralentir le développement de *S. cerevisiae* sans impacter sa capacité fermentaire et d'inhiber le développement des espèces *C. zemplinina* et *H. uvarum* que nous souhaitons écarter. De plus, le CO<sub>2</sub> permet de stimuler le développement de *T. delbrueckii* et de *Metschnikowia* spp., il inhibe malgré tout la croissance de *P. kluyveri*. L'utilisation du produit F permet quant à elle de stimuler le démarrage de la croissance de *Metschnikowia* spp. et d'améliorer la survie de *T. delbrueckii* et *P. kluyveri*.

Les deux souches de *S. cerevisiae* (phase de latence courte et phase de latence longue) réagissent de façon similaire en présence des différents facteurs testés. De plus, leur composition lipidique évolue également de la même façon. En revanche, concernant les non-*Saccharomyces*, une grande variabilité est observée au niveau de la composition lipidique. En fonction des espèces, la capacité biotique et/ou le taux de mortalité et/ou la capacité fermentaire sont corrélés à la composition lipidique. La composition lipidique du produit F ne permet pas d'expliquer toutes les variations observées sur les paramètres de croissance et de cinétique fermentaire. Il faut cependant noter que ce produit commercial n'est pas constitué uniquement de lipides mais également de vitamines, de minéraux et d'oligo-éléments qui impactent le développement cellulaire.

## 2.2 Mélange d'espèces non-*Saccharomyces*

L'impact des deux facteurs sélectionnés (saturation en CO<sub>2</sub> et supplémentation du moût avec le produit F) a été étudié, dans un premier temps, sur le mélange des 5 espèces de levure non-*Saccharomyces* puis, dans un deuxième temps en présence de *S. cerevisiae* (à phase de latence courte ou longue). Les conditions de fermentation étaient identiques au chapitre précédent.

### 2.2.1 Effet de la saturation en CO<sub>2</sub> et de la supplémentation du moût avec le produit F sur un mélange d'espèces non-*Saccharomyces*

L'impact du CO<sub>2</sub> et du produit F a été étudié sur le mélange d'espèces de non-*Saccharomyces* sans présence de *S. cerevisiae*, permettant de déterminer si les effets observés en cultures pures sont retrouvés en mélange. Les concentrations d'inoculation utilisées dans le mélange de non-*Saccharomyces* ont été choisies afin de recréer une population représentative de celle retrouvée dans les moûts en début de fermentation : *H. uvarum* (Hu, 3.10<sup>5</sup> cell vivantes/mL), *C. zemplinina* et *Metschnikowia* spp. (Cz et Mets 10<sup>5</sup> cell vivantes/mL), *T. delbrueckii* et *P. kluyveri* (Td et Pk 5. 10<sup>4</sup> cell vivantes/mL). 4 modalités ont été réalisées :

- Mélange de non-*Saccharomyces* seul (sans supplémentation ni saturation)
- Mélange de non-*Saccharomyces* + supplémentation avec le produit F
- Mélange de non-*Saccharomyces* + saturation du moût en CO<sub>2</sub>
- Mélange de non-*Saccharomyces* + supplémentation avec le produit F + saturation du moût en CO<sub>2</sub>

Le suivi des populations des levures non-*Saccharomyces* a été effectué par dénombrement sur milieu gélosé différentiel WL additionné de cycloheximide. L'utilisation de ce milieu a permis de différencier les colonies de *H. uvarum* (colonie de grande taille, vert foncé), *C. zemplinina* (colonie de taille moyenne, bord blanc et centre vert clair) et *Metschnikowia* spp. (colonie de taille moyenne, blanches base marron clair. Présence d'un halo marron autour des colonies) mais pas celle de *T. delbrueckii* de *P. kluyveri*. En effet, les colonies des deux espèces ont le même aspect (petite colonie blanche). Néanmoins, ces deux espèces présentant un intérêt en œnologie, nous étudierons ici leur évolution commune.

Aucune des quatre modalités n'a permis une fermentation complète. Les modalités « mélange » (sans saturation et sans supplémentation) et « mélange + Pdt F » effectuent respectivement 85 et 86% de la fermentation alcoolique (teneur en alcool 9,74 et 9,64% (v/v)). En présence de CO<sub>2</sub> seul

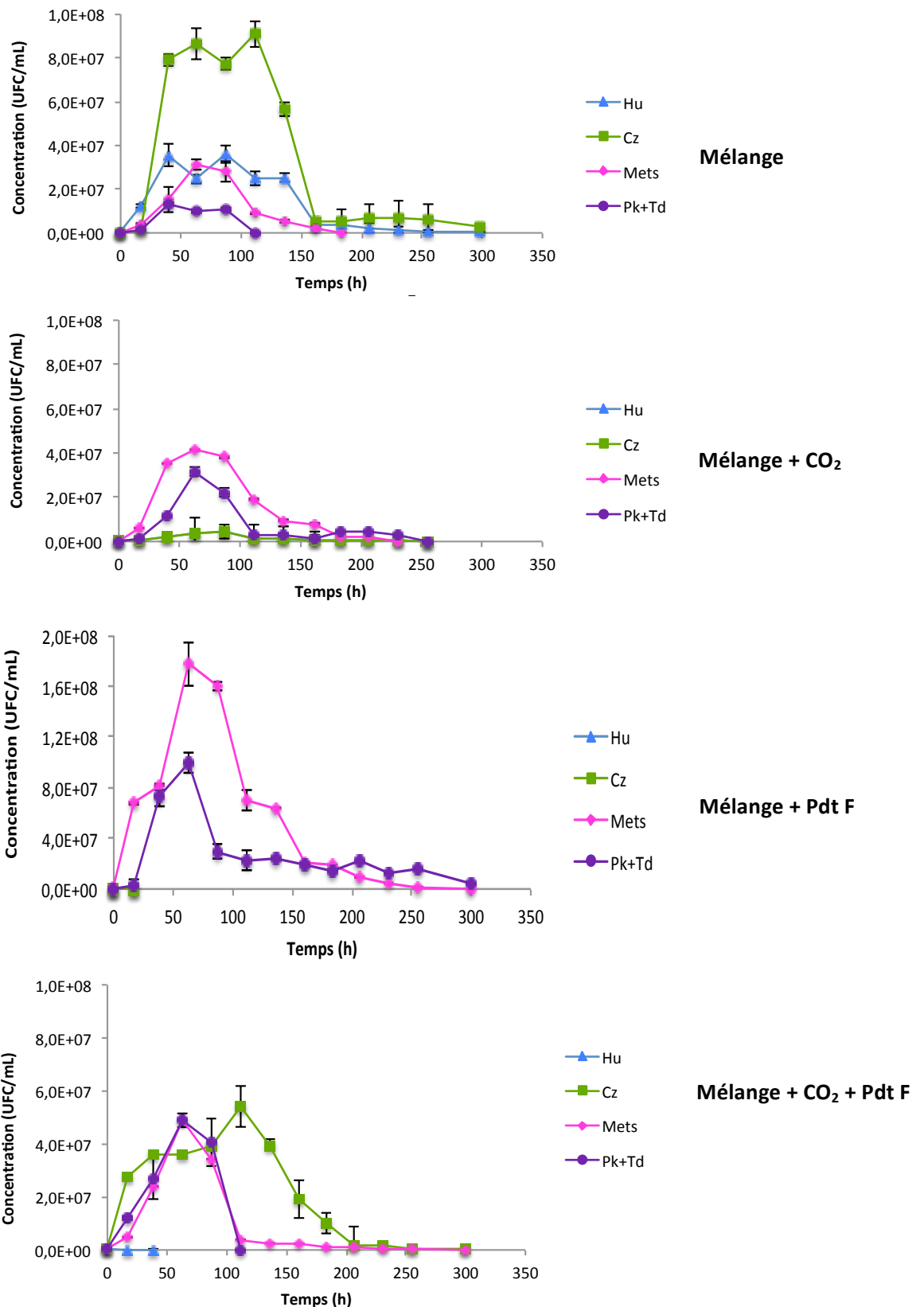


ou de CO<sub>2</sub> et du produit F, la capacité fermentaire globale du mélange d'espèces diminue respectivement de 13 et 28% par rapport à la modalité « mélange ».

Les cinétiques de croissance sont présentées sur la figure 39.

Dans le cas de la modalité « mélange », *C. zemplinina* domine la fermentation et atteint une population maximale de  $8,5 \cdot 10^7$  UFC/mL après 62h. *H. uvarum*, *Metschnikowia* spp. et *P. kluyveri*/*T. delbrueckii* sont caractérisées par une croissance plus lente que *C. zemplinina* et sont présentes à des niveaux de populations inférieurs ( $< 4 \cdot 10^7$  UFC/mL). Les populations des différentes espèces se maintiennent jusqu'à 125h environ avant de chuter rapidement. En présence de CO<sub>2</sub> ou du produit F, le comportement des cinq espèces est similaire, mais les niveaux des populations sont plus élevés en présence du produit F. Les croissances de *H. uvarum* et *C. zemplinina* sont inhibées, *Metschnikowia* spp. domine la fermentation suivie de *P. kluyveri*/*T. delbrueckii*. En revanche, lorsque le moût est à la fois saturé en CO<sub>2</sub> et supplémenté avec le produit F, *C. zemplinina*, *Metschnikowia* spp. et *P. kluyveri*/*T. delbrueckii* ont une population maximale similaire (environ  $5 \cdot 10^7$  UFC/mL).

Ces résultats sont en accord avec les ceux obtenus lors des cultures pures. En effet, en présence de CO<sub>2</sub>, une diminution de la capacité fermentaire était observée pour l'ensemble des espèces. La croissance de *C. zemplinina*, de *H. uvarum* et de *P. kluyveri* était fortement inhibée contrairement à celle de *Metschnikowia* spp. et de *T. delbrueckii* qui était stimulée. Ces résultats permettent de supposer que, en présence de CO<sub>2</sub>, *T. delbrueckii* est majoritairement retrouvée par rapport à *P. kluyveri*. De plus, en culture pure le produit F, ralentissait la fermentation alcoolique pour *Metschnikowia* spp. mais pas pour les autres espèces. Ce produit avait également permis de ralentir le développement de *C. zemplinina* et de *H. uvarum* (diminution du taux de croissance et augmentation du taux de mortalité) et de favoriser celui de *Metschnikowia* spp., *T. delbrueckii* et *P. kluyveri* (augmentation du taux de croissance pour *Metschnikowia* spp., diminution du taux de mortalité pour ces trois espèces).



**Figure 39: Cinétiques de croissance des espèces non-Saccharomyces en fonction des différentes modalités**

Taux d'inoculation : *H. uvarum* (Hu)  $3 \cdot 10^5$  cell viables/mL, *C. zemplinina* (Cz)  $10^5$  cell viables/mL, *Metschnikowia* spp. (Mets)  $10^5$  cell viables/mL, *T. delbrueckii* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *P. kluyveri* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL.

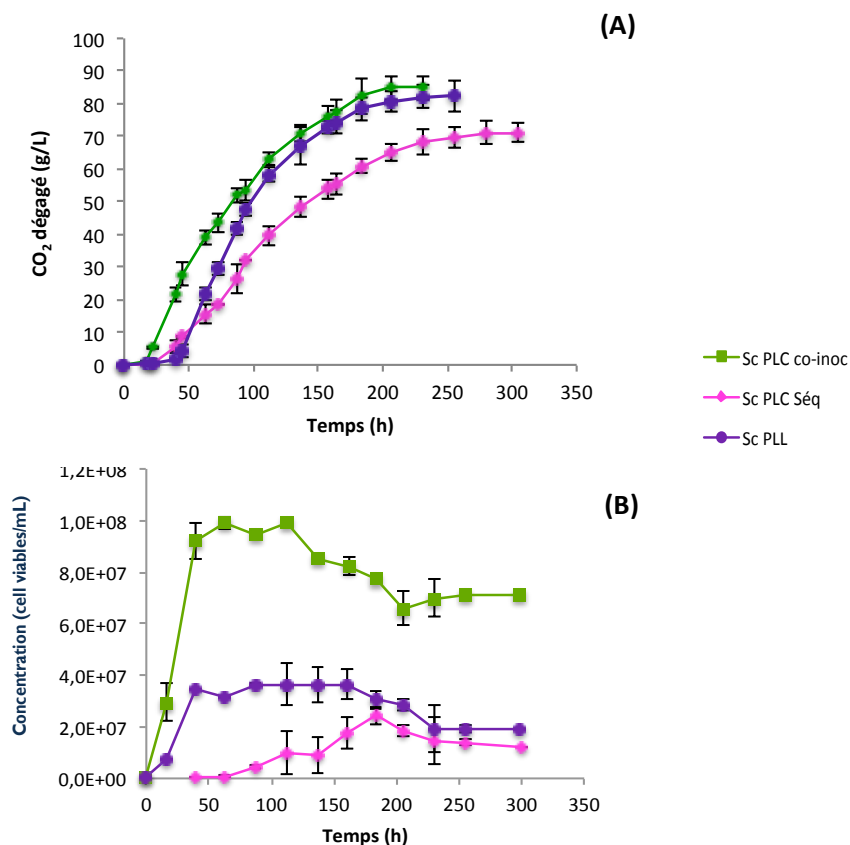
Mélange : fermentations effectuées uniquement avec le mélange d'espèces non-Saccharomyces, sans saturation ni supplémentation du moût ; Mélange + CO<sub>2</sub> : fermentations effectuées avec le mélange d'espèces non-Saccharomyces et saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation ; Mélange + Pdt F : fermentations effectuées avec le mélange d'espèces non-Saccharomyces et supplémentation du moût avec le produit F ; Mélange + CO<sub>2</sub> + Pdt F : fermentations effectuées avec le mélange d'espèces non-Saccharomyces, saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation et supplémentation du moût avec le produit commercial F.

### 2.2.2 Effet de l'inoculation de *Saccharomyces cerevisiae*

Nous avons ensuite étudié l'impact de l'inoculation de *S. cerevisiae* sur la dynamique de population des cinq espèces de non-*Saccharomyces* du mélange. Afin de différencier *S. cerevisiae* des levures non-*Saccharomyces*, deux souches de *S. cerevisiae* exprimant constitutivement la protéine YFP ont été utilisées (une à phase de latence courte (PLC) et une à phase de latence longue (PLL)), ce qui a permis leur dénombrement par cytométrie en flux. Dans le cas de *S. cerevisiae* PLC, deux modes d'inoculation ont été testés : co-inoculation (inoculation simultanée de *S. cerevisiae* et des 5 espèces non-*Saccharomyces*) ou inoculation séquentielle. Dans ce dernier cas, *S. cerevisiae* est introduite 24h après l'inoculation des 5 espèces de non-*Saccharomyces*. Concernant *S. cerevisiae* PLL, seul le mode co-inoculation a été effectué.

Comme décrit précédemment dans le paragraphe 1.1.1, la souche Sc PLC YFP+ a un comportement similaire à la souche commerciale *S. cerevisiae* X5 (cinétiques de croissance et de fermentation identiques). Son démarrage rapide devrait limiter le développement des levures non-*Saccharomyces* en co-inoculation (compétition pour le substrat...). Par contre, son inoculation 24h après devrait permettre un développement plus important des levures non-*Saccharomyces*. Concernant la souche Sc PLL YFP+, son comportement sur le développement des non-*Saccharomyces* n'est pas connu. Cependant, son démarrage plus lent devrait favoriser le développement des non-*Saccharomyces*. De plus, son métabolisme soufré a récemment été étudié. Sc PLL possède un gène *SSU1* inactif sur le chromosome XV-t-XVI. Or, le gène *SSU1* code pour une pompe à sulfites permettant à la levure de rejeter le SO<sub>2</sub> qui est rentré dans sa cellule dans le milieu extracellulaire (détoxification). Sc PLL présente donc une déficience au niveau du fonctionnement de la pompe à sulfites et rejette donc moins de SO<sub>2</sub> dans le milieu que Sc PLC, ce qui explique son démarrage moins rapide de la fermentation (Zimmer, 2013). L'utilisation de Sc PLL devrait donc particulièrement favoriser les non-*Saccharomyces* présentant une sensibilité forte au SO<sub>2</sub>.

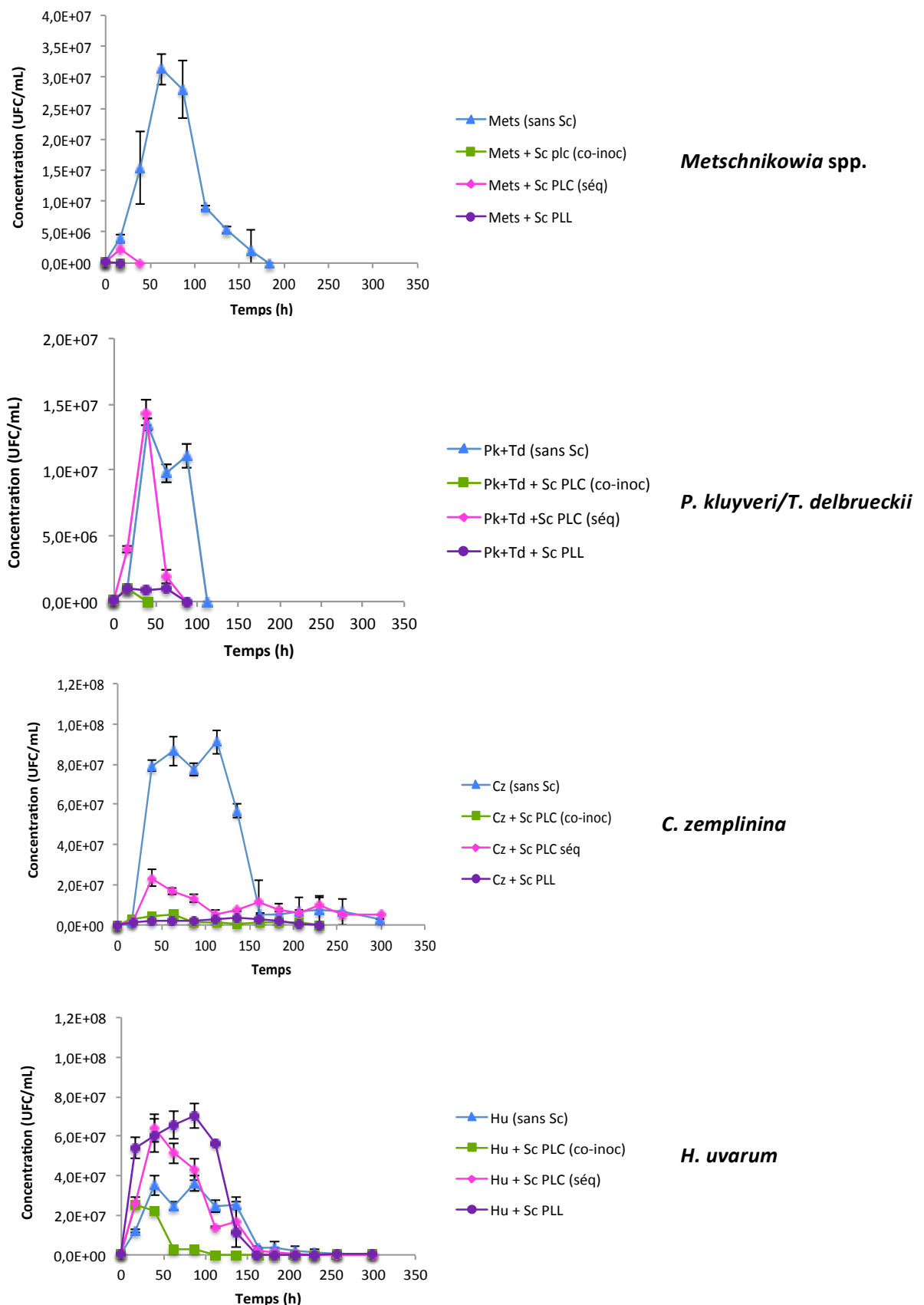
La figure 40 présente les cinétiques de fermentation et de croissance des deux souches de *S. cerevisiae* (Sc PLC et Sc PLL) et des deux modes d'inoculation.



**Figure 40: Cinétiques de fermentation (A) et de croissance (B) de *S. cerevisiae* en présence du mélange d'espèces de non-*Saccharomyces* en fonction de la souche de *S. cerevisiae* utilisée et du mode d'inoculation**

Taux d'inoculation : *H. uvarum* (Hu)  $3 \cdot 10^5$  cell viables/mL, *C. zemplinina* (Cz)  $10^5$  cell viables/mL, *Metschnikowia* spp. (Mets)  $10^5$  cell viables/mL, *T. delbrueckii* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *P. kluyveri* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *S. cerevisiae* (Sc)  $5 \cdot 10^5$  cell viables/mL. Les fermentations ont été effectuées en présence du mélange d'espèces non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae*, dans du moût non saturé en CO<sub>2</sub> et non supplémenté. Sc PLC : *S. cerevisiae* à phase de latence courte ; Sc PLL : *S. cerevisiae* à phase de latence longue ; co-inoc : *S. cerevisiae* a été inoculée en même temps que le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* ; séq : *S. cerevisiae* a été inoculée 24h après le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* (séquentiel). Dans le cas de Sc PLL, la co-inoculation a uniquement été effectuée.

L'utilisation de la souche à phase de latence courte de *S. cerevisiae* en inoculation séquentielle ne permet pas de terminer la fermentation (87% de la réaction). Les cinétiques de croissance de *S. cerevisiae* sont variables selon le mode d'inoculation et le type de souche utilisée. En effet, c'est en co-inoculation, et avec la souche à phase de latence courte que la croissance de *S. cerevisiae* est la plus rapide. La population maximale ( $10^8$  cell viables/mL) est obtenue après 63h de fermentation. En revanche, lorsque la même souche de *S. cerevisiae* est inoculée 24h après le mélange de levures non-*Saccharomyces*, sa croissance est fortement ralentie. Aucune croissance n'est observée pendant les 24h suivant son inoculation pour finalement atteindre très tardivement (180h) seulement  $2,5 \cdot 10^7$  cell viables/mL, soit une diminution de 75% de la population maximale par rapport à la co-inoculation. Cette faible croissance est sûrement en partie expliquée par une forte carence du milieu en nutriments lors de son inoculation, due au développement préalable des levures non-*Saccharomyces*. Enfin, si *S. cerevisiae* PLL a une croissance plus lente que la souche PLC en co-inoculation et atteint une population maximale plus faible ( $3,8 \cdot 10^7$  UFC/mL soit -62%). Ce niveau de population perdure durant la fermentation alcoolique contrairement à la modalité séquentielle.



**Figure 41: Evolution de la population de *Metschnikowia* spp., *P. kluyveri* + *T. delbrueckii*, *C. zemplinina* et *H. uvarum* en fonction du mode d'inoculation et du type de souche de *S. cerevisiae*.**

Taux d'inoculation : *H. uvarum* (Hu)  $3 \cdot 10^5$  cell viables/mL, *C. zemplinina* (Cz)  $10^5$  cell viables/mL, *Metschnikowia* spp. (Mets)  $10^5$  cell viables/mL, *T. delbrueckii* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *P. kluyveri* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *S. cerevisiae* (Sc)  $5 \cdot 10^5$  cell viables/mL. Les fermentations ont été effectuées dans du moût non saturé en  $\text{CO}_2$  et non supplémenté. Sans Sc : mélange de non-*Saccharomyces* seul. Les autres fermentations ont été effectuées en présence du mélange d'espèces non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae*. Sc PLC : *S. cerevisiae* à phase de latence courte ; Sc PLL : *S. cerevisiae* à phase de latence longue ; co-inoc : *S. cerevisiae* a été inoculée en même temps que le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* ; séq : *S. cerevisiae* a été inoculée 24h après le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* (séquentiel). Dans le cas de Sc PLL, la co-inoculation a uniquement été effectuée.

Les cinétiques de croissance de *Metschnikowia* spp. et de *C. zemplinina* évoluent de la même façon quelle que soit la souche de *S. cerevisiae* et le mode d'inoculation utilisés (figure 41). En présence de *S. cerevisiae* PLC, lorsqu'elle est inoculée en co-inoculation, et de *S. cerevisiae* PLL aucune croissance n'est observée. Lorsque la souche PLC est inoculée en séquentiel, une faible croissance de ces deux espèces est observée par rapport à la modalité sans *S. cerevisiae* où *Metschnikowia* spp. et *C. zemplinina* atteignaient respectivement  $3,2 \cdot 10^7$  et  $8,5 \cdot 10^7$  UFC/mL, puis la population chute rapidement.

En présence de *S. cerevisiae* PLC en co-inoculation, une faible croissance et une chute rapide des populations de *H. uvarum* et de *P.kluyveri/T.delbrueckii* sont observées. En revanche, *H. uvarum* présente une croissance plus importante lorsque la souche de *S. cerevisiae* à phase de latence longue est utilisée ou lorsque la souche de *S. cerevisiae* à phase de latence courte est inoculée plus tardivement (séquentiel).

Enfin, concernant *P. kluyveri/T. delbrueckii*, durant les 38 premières heures de la fermentation, les cinétiques de croissance sont identiques en absence de *S. cerevisiae* PLC ou lorsque *S. cerevisiae* PLC est inoculée en séquentiel. Dans ce dernier cas, la population chute rapidement, -87% par rapport à la modalité sans *S. cerevisiae*. En présence de *S. cerevisiae* PLL, une croissance plus lente mais se maintenant plus longtemps, est observée pour *P. kluyveri/T. delbrueckii* par rapport aux modalités sans *S. cerevisiae* ou avec *S. cerevisiae* PLC en séquentiel. En effet, la population maximale de *P. kluyveri/T. delbrueckii* atteint  $5 \cdot 10^6$  cell viables/mL en présence de *S. cerevisiae* PLL, au lieu de  $1 \cdot 10^7$  UFC/mL sans *S. cerevisiae* (soit une chute de -65%).

### **2.2.3 Effet de la saturation du moût en CO<sub>2</sub> et/ou du produit F sur le mélange de levures non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae*.**

Nous avons pu mettre en évidence précédemment que la saturation du moût en CO<sub>2</sub> ou la supplémentation avec le produit commercial F tend à stimuler les espèces de non-*Saccharomyces* d'intérêt (*Metschnikowia* spp., *T. delbrueckii* et *P. kluyveri*) et inhiber les espèces indésirables (*C. zemplinina* et *H. uvarum*) que ce soit en cultures pures ou en mélange. Le mode d'inoculation (co-inoculation ou séquentiel) et la souche de *S. cerevisiae* (phase de latence courte ou phase de latence longue) utilisés affectent également la dynamique de population des différentes espèces de levures non-*Saccharomyces* de notre mélange.

L'objectif est maintenant de déterminer quelle(s) combinaison(s) (facteur(s) abiotique(s)/ souche de *S. cerevisiae*/mode d'inoculation) permet à la fois de stimuler les espèces de levure d'intérêt, de ralentir la croissance des espèces indésirables tout en permettant la dégradation totale des sucres. Douze combinaisons ont été testées et sont présentées dans le tableau 20.

### 2.2.3.1 Cinétiques de fermentation alcoolique

L'analyse des durées de phases de latence de fermentation a permis de mettre en évidence que la supplémentation du produit F réduit la durée de cette phase, par rapport à la même culture non supplémentée (tableau 20). Au contraire, la saturation en CO<sub>2</sub> a augmenté la durée de la phase de latence, indépendamment de la souche et du mode d'inoculation utilisés. De plus, en présence de la souche *S. cerevisiae* à phase de latence longue, la durée de la phase de latence de 66h observée en culture pure, est considérablement réduite. En effet, elle est comprise entre 30 et 40h selon les modalités (supplémentation ou non en produit F, saturation ou non en CO<sub>2</sub>).

**Tableau 20: Impact de la saturation en CO<sub>2</sub>, de la supplémentation avec le produit, de la souche de *S. cerevisiae* utilisée et du mode d'inoculation sur la durée de la phase de latence de fermentation alcoolique**

Combinaison	Durée de la phase de latence (h)
(Mélange +) Sc PLC co-inoc	18,2 <sup>b</sup> ± 0,9
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Sc PLC co-inoc	22,4 <sup>a</sup> ± 1,5
(Mélange +) Pdt F + Sc PLC co-inoc	16,0 <sup>c</sup> ± 0,3
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Pdt F + Sc PLC co-inoc	20,2 <sup>ab</sup> ± 2,4
(Mélange +) Sc PLC séq	25,7 <sup>b</sup> ± 1,2
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Sc PLC séq	44,4 <sup>a</sup> ± 2,8
(Mélange +) Pdt F + Sc PLC séq	20,2 <sup>c</sup> ± 0,7
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Pdt F + Sc PLC séq	45,2 <sup>a</sup> ± 3,1
(Mélange +) Sc PLL	34,4 <sup>b</sup> ± 1,3
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Sc PLL	36,5 <sup>b</sup> ± 2,1
(Mélange +) Pdt F + Sc PLL	30,4 <sup>c</sup> ± 1,8
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Pdt F + Sc PLL	41,5 <sup>a</sup> ± 3,1

Le tableau 21 montre que 7 combinaisons parmi les 12 testées permettent d'achever la fermentation alcoolique avec un taux d'alcool compris entre 11,31 et 11,38 % (v/v). Lors des arrêts de fermentation, les concentrations en sucres résiduels sont comprises entre 20,2 et 50,5 g/L.

**Tableau 21: Impact de la saturation en CO<sub>2</sub>, de la supplémentation avec le produit, de la souche de *S. cerevisiae* utilisée et du mode d'inoculation sur la concentration en sucres résiduels et le titre alcoométrique volumique des vins.**

Combinaison	Sucres résiduels (g/L)	Titre Alcoométrique Volumique (% v/v)		
(Mélange +) Sc PLC co-inoc	0,9 <sup>c</sup> ± 0,05	11,38 <sup>a</sup>	±	0,02
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Sc PLC co-inoc	0,9 <sup>c</sup> ± 0,1	11,31 <sup>a</sup>	±	0,03
(Mélange +) Pdt F + Sc PLC co-inoc	0,3 <sup>c</sup> ± 0,3	11,34 <sup>a</sup>	±	0,02
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Pdt F + Sc PLC co-inoc	20,2 <sup>b</sup> ± 3,4	10,2 <sup>b</sup>	±	0,04
(Mélange +) Sc PLC séq	26,7 <sup>b</sup> ± 2,8	9,87 <sup>b</sup>	±	0,07
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Sc PLC séq	50,5 <sup>a</sup> ± 4,6	8,51 <sup>c</sup>	±	0,06
(Mélange +) Pdt F + Sc PLC séq	1,1 <sup>c</sup> ± 0,3	11,32 <sup>a</sup>	±	0,03
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Pdt F + Sc PLC séq	26,3 <sup>b</sup> ± 3,8	9,89 <sup>b</sup>	±	0,08
(Mélange +) Sc PLL	1,3 <sup>c</sup> ± 0,6	11,32 <sup>a</sup>	±	0,03
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Sc PLL	0,9 <sup>c</sup> ± 0,7	11,35 <sup>a</sup>	±	0,03
(Mélange +) Pdt F + Sc PLL	0,4 <sup>c</sup> ± 0,2	11,36 <sup>a</sup>	±	0,04
(Mélange +) CO <sub>2</sub> + Pdt F + Sc PLL	20,6 <sup>b</sup> ± 3,8	10,18 <sup>b</sup>	±	0,05

a,b : groupes à l'issue du test de Kruskal-Wallis (p<0,05)

Les fermentations ont été effectuées en présence du mélange d'espèces non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae*. Sc PLC : *S. cerevisiae* à phase de latence courte ; Sc PLL : *S. cerevisiae* à phase de latence longue ; co-inoc : *S. cerevisiae* a été inoculée en même temps que le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* ; séq : *S. cerevisiae* a été inoculée 24h après le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* (séquentiel). Dans le cas de Sc PLL, la co-inoculation a uniquement été effectuée. CO<sub>2</sub> : saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique ; Pdt F supplémentation du moût avec le produit commercial F.

### 2.2.3.2 Cinétiques de croissance

Dans un premier temps, nous allons analyser les cinétiques de croissance de *S. cerevisiae* et des levures non-*Saccharomyces* afin d'étudier ces arrêts de fermentation.

#### 2.2.3.2.1 Combinaisons entraînant des arrêts de fermentation

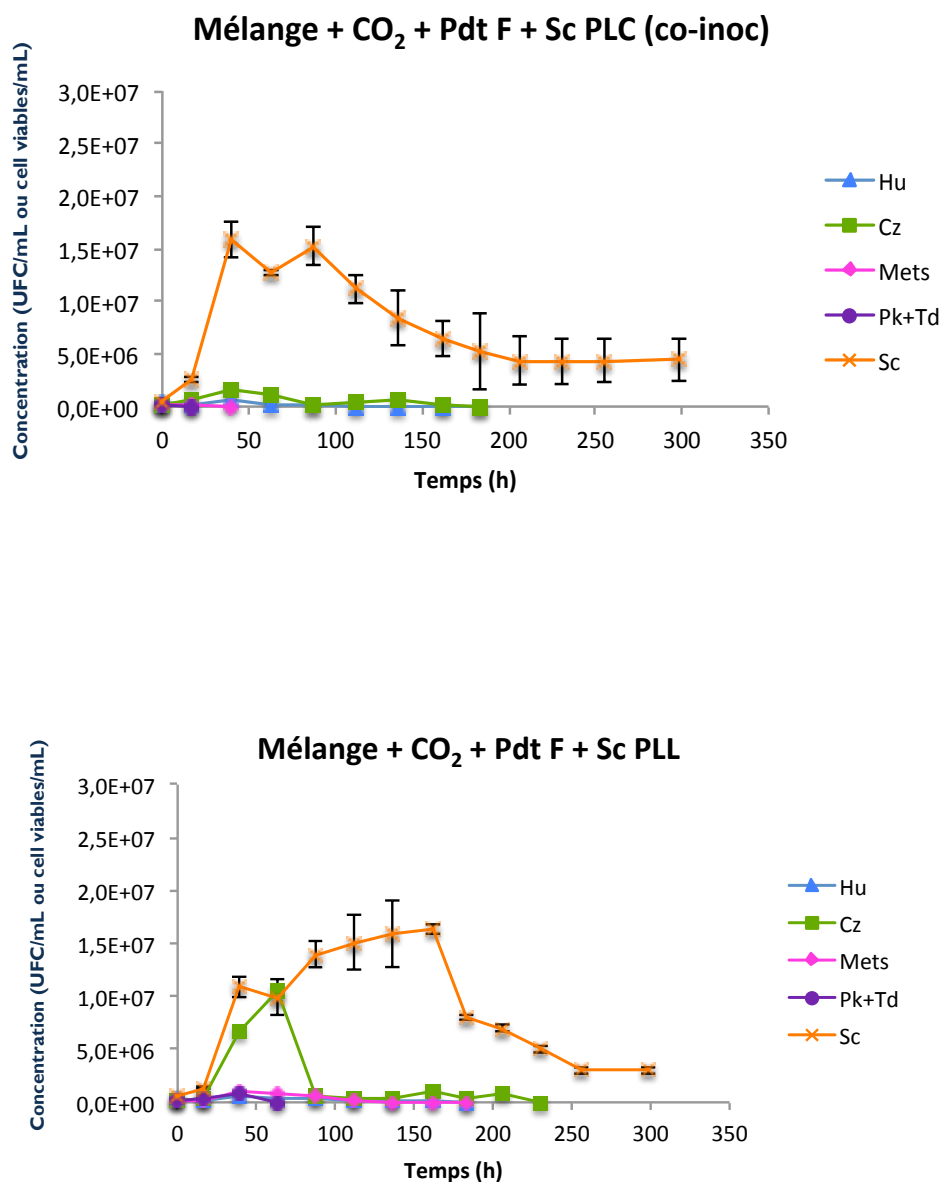
Parmi les 12 combinaisons testées, 5 donnent lieu à des arrêts de fermentation:

- CO<sub>2</sub> + produit F + *S. cerevisiae* phase de latence courte (co-inoculation)
- *S. cerevisiae* phase de latence courte (inoculation séquentielle)
- CO<sub>2</sub> + *S. cerevisiae* phase de latence courte (inoculation séquentielle)
- CO<sub>2</sub> + produit F + *S. cerevisiae* phase de latence courte (inoculation séquentielle)
- CO<sub>2</sub> + produit F + *S. cerevisiae* phase de latence longue



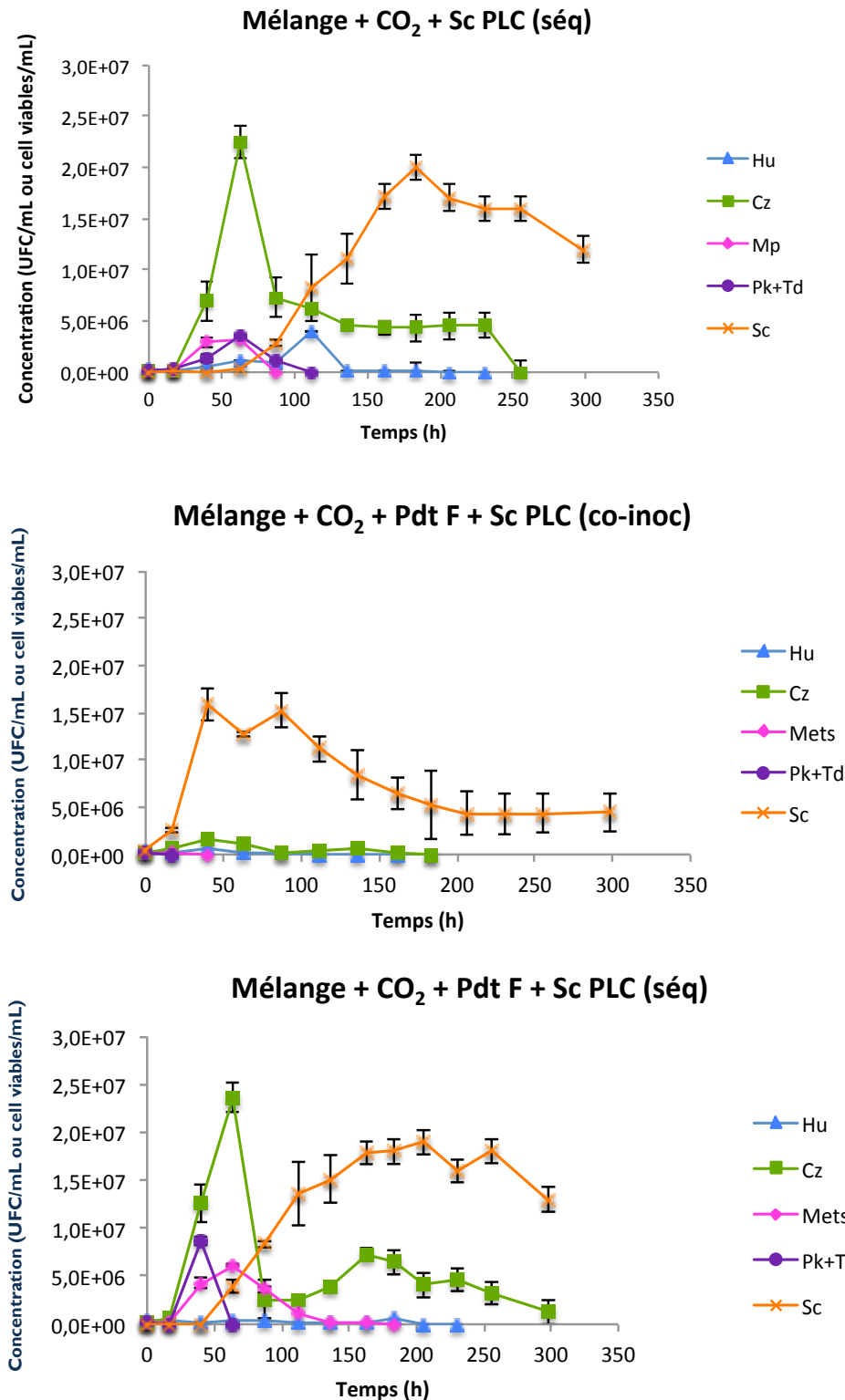
Les cinétiques de croissance des différentes espèces de non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae* sont présentées sur la figure 42. Deux causes peuvent expliquer les arrêts de fermentation :

- Une faible croissance de *S. cerevisiae* ; c'est le cas des modalités CO<sub>2</sub> + produit F lors de l'utilisation de *S. cerevisiae* à phase de latence courte (co-inoculation) et de *S. cerevisiae* PLL. En effet, cette combinaison a un effet inhibiteur sur ces deux souches de *S. cerevisiae* : les populations maximales atteintes sont de 1,5 cell viables/mL alors que pour les autres modalités impliquant *S. cerevisiae* PLC (co-inoculation) et *S. cerevisiae* PLL elles sont comprises entre 5 .10<sup>7</sup> cell viables/mL et 1. 10<sup>8</sup> cell viables/mL (figure 43).
- Une croissance importante des levures non-*Saccharomyces* (forte compétition avec *S. cerevisiae*) ; c'est le cas des modalités où la souche *S. cerevisiae* à phase de latence courte est inoculée tardivement (inoculation séquentielle). En effet, dans ces trois modalités, les non-*Saccharomyces* restent majoritaires durant les 70 premières heures de la fermentation alcoolique. *C. zemplinina* est majoritaire en présence de CO<sub>2</sub> avec et sans produit F et atteint des populations de 2,5 .10<sup>7</sup> UCF/mL. En absence de CO<sub>2</sub> et du produit F, atteint une population légèrement inférieure (2. 10<sup>7</sup> UFC/mL). Dans le cas de cette modalité, *H. uvarum* est alors majoritaire avec une population maximale de 6,5.10<sup>7</sup> UFC/mL. Dans ces trois modalités, *Metschnikowia* spp. et *P. kluyveri*/*T. delbrueckii* sont également détectées mais présentes à des niveaux de populations inférieurs à *C. zemplinina* et/ou *H. uvarum*.



**Figure 42: Cinétiques de croissance des différentes espèces de non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae* dans le cas des arrêts de fermentation**

Taux d'inoculation : *H. uvarum* (Hu)  $3 \cdot 10^5$  cell viables/mL, *C. zemplinina* (Cz)  $10^5$  cell viables/mL, *Metschnikowia* spp. (Mets)  $10^5$  cell viables/mL, *T. delbrueckii* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *P. kluyveri* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *S. cerevisiae* (Sc)  $5 \cdot 10^5$  cell viables/mL. Les fermentations ont été effectuées en présence du mélange d'espèces non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae*. Sc PLC : *S. cerevisiae* à phase de latence courte ; Sc PLL : *S. cerevisiae* à phase de latence longue ; co-inoc : *S. cerevisiae* a été inoculée en même temps que le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* ; séq : *S. cerevisiae* a été inoculée 24h après le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* (séquentiel). Dans le cas de Sc PLL, la co-inoculation a uniquement été effectuée. CO<sub>2</sub> : saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique ; Pdt F supplémentation du moût avec le produit commercial F ; CO<sub>2</sub> + Pdt F : saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique et supplémentation du moût avec le produit commercial F. Le suivi des populations de *S. cerevisiae* a été effectué par cytométrie en flux et les résultats sont exprimés en cell/ viables/mL. Le suivi des populations des levures non-*Saccharomyces* a été effectué sur milieu gélosé WL et les résultats sont exprimés en UFC/mL.

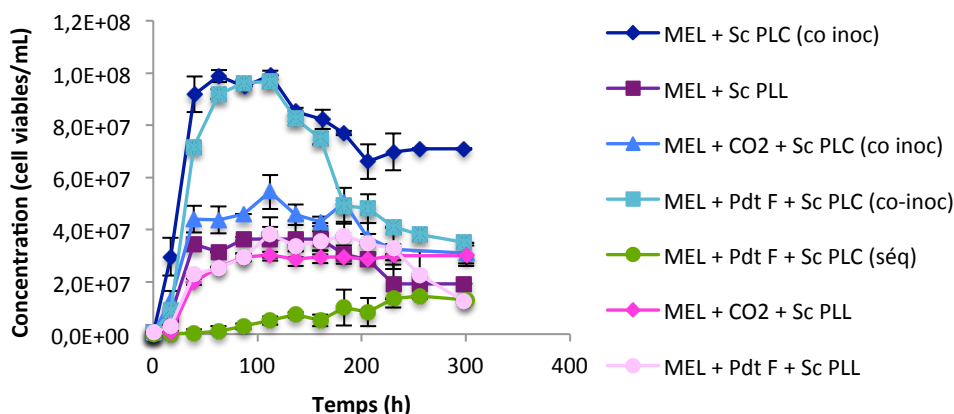


**Figure 42 (suite): Cinétiques de croissance des différentes espèces de non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae* dans le cas des arrêts de fermentation**

Taux d'inoculation : *H. uvarum* (Hu)  $3 \cdot 10^5$  cell viables/mL, *C. zemplinina* (Cz)  $10^5$  cell viables/mL, *Metschnikowia* spp. (Mets)  $10^5$  cell viables/mL, *T. delbrueckii* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *P. kluyveri* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *S. cerevisiae* (Sc)  $5 \cdot 10^5$  cell viables/mL. Les fermentations ont été effectuées en présence du mélange d'espèces non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae*. Sc PLC : *S. cerevisiae* à phase de latence courte ; Sc PLL : *S. cerevisiae* à phase de latence longue ; co-inoc : *S. cerevisiae* a été inoculée en même temps que le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* ; séq : *S. cerevisiae* a été inoculée 24h après le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* (séquentiel). Dans le cas de Sc PLL, la co-inoculation a uniquement été effectuée. CO<sub>2</sub> : saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique ; Pdt F supplémentation du moût avec le produit commercial F ; CO<sub>2</sub> + Pdt F : saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique et supplémentation du moût avec le produit commercial F. Le suivi des populations de *S. cerevisiae* a été effectué par cytométrie en flux et les résultats sont exprimés en cell/ viables/mL. Le suivi des populations des levures non-*Saccharomyces* a été effectué sur milieu gélosé WL et les résultats sont exprimés en UFC/mL.

### 2.2.3.2.2 Combinaisons permettant de réaliser des fermentations alcooliques complètes

La figure 43 présente les cinétiques de croissances de *S. cerevisiae* pour les 7 combinaisons pour lesquelles la totalité des sucres est consommée.



**Figure 43: Cinétiques de croissance de *S. cerevisiae* (PLC ET PLL) en présence du mélange d'espèces non-*Saccharomyces* et en fonction du facteur abiotique testé**

Taux d'inoculation : *H. uvarum* (Hu)  $3 \cdot 10^5$  cell viables/mL, *C. zemplinina* (Cz)  $10^5$  cell viables/mL, *Metschnikowia* spp. (Mets)  $10^5$  cell viables/mL, *T. delbrueckii* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *P. kluyveri* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *S. cerevisiae* (Sc)  $5 \cdot 10^5$  cell viables/mL. Les fermentations ont été effectuées en présence du mélange d'espèces non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae*. Sc PLC : *S. cerevisiae* à phase de latence courte ; Sc PLL : *S. cerevisiae* à phase de latence longue ; co-inoc : *S. cerevisiae* a été inoculée en même temps que le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* ; séq : *S. cerevisiae* a été inoculée 24h après le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* (séquentiel). Dans le cas de Sc PLL, la co-inoculation a uniquement été effectuée. CO<sub>2</sub> : saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique ; Pdt F supplémentation du moût avec le produit commercial F. Le suivi des populations de *S. cerevisiae* a été effectué par cytométrie en flux et les résultats sont exprimés en cell/ viables/mL. Le suivi des populations des levures non-*Saccharomyces* a été effectué sur milieu gélosé WL et les résultats sont exprimés en UFC/mL.

- ***Saccharomyces cerevisiae* à phase de latence courte (Sc PLC)**

Lorsque *S. cerevisiae* PLC est inoculée de façon séquentielle, 24h après les non-*Saccharomyces*, et en présence du produit F, sa croissance est très lente et très faible. Sa population maximale est de  $1,5 \cdot 10^7$  cellules viables/mL après 230h de fermentation. Pour cette souche, les populations maximales les plus élevées sont observées lorsqu'elle est co-inoculée avec le mélange de non-*Saccharomyces*, avec ou sans le produit F. Les populations maximales atteintes pour ces deux modalités sont similaires (entre  $9,8 \cdot 10^7$  et  $1 \cdot 10^8$  cellules viables/mL). En revanche, une chute de viabilité plus importante est observée en présence du produit F. Lors de la saturation du moût en CO<sub>2</sub>, une diminution de la vitesse de croissance, de la population maximale et du taux de mortalité sont constatées pour Sc PLC par rapport à la modalité non saturée (conformément à ce qui a été observé en cultures pures). La population maximale est particulièrement affectée puisqu'elle diminue de 57 % ( $4,3 \cdot 10^7$  cell viables/mL au lieu de  $1 \cdot 10^8$  cell viables/mL).

- **Saccharomyces cerevisiae à phase de latence longue (Sc PLL)**

Concernant *S. cerevisiae* à phase de latence longue (Sc PLL), la croissance la plus rapide est obtenue lorsque cette souche est cultivée avec le mélange de levures non-*Saccharomyces* (sans saturation ni supplémentation). Sa population maximale est alors de  $3,8 \cdot 10^7$  cellules viables/mL, après 39h de fermentation. En présence de CO<sub>2</sub> et du produit F, les populations maximales sont atteintes respectivement après 87 et 112h de fermentation ( $3,7 \cdot 10^7$  et  $4 \cdot 10^7$  cell viables/mL). Ces décalages par rapport aux cultures sans CO<sub>2</sub> et produit F avaient déjà été observés en culture pure (paragraphe 2.1).

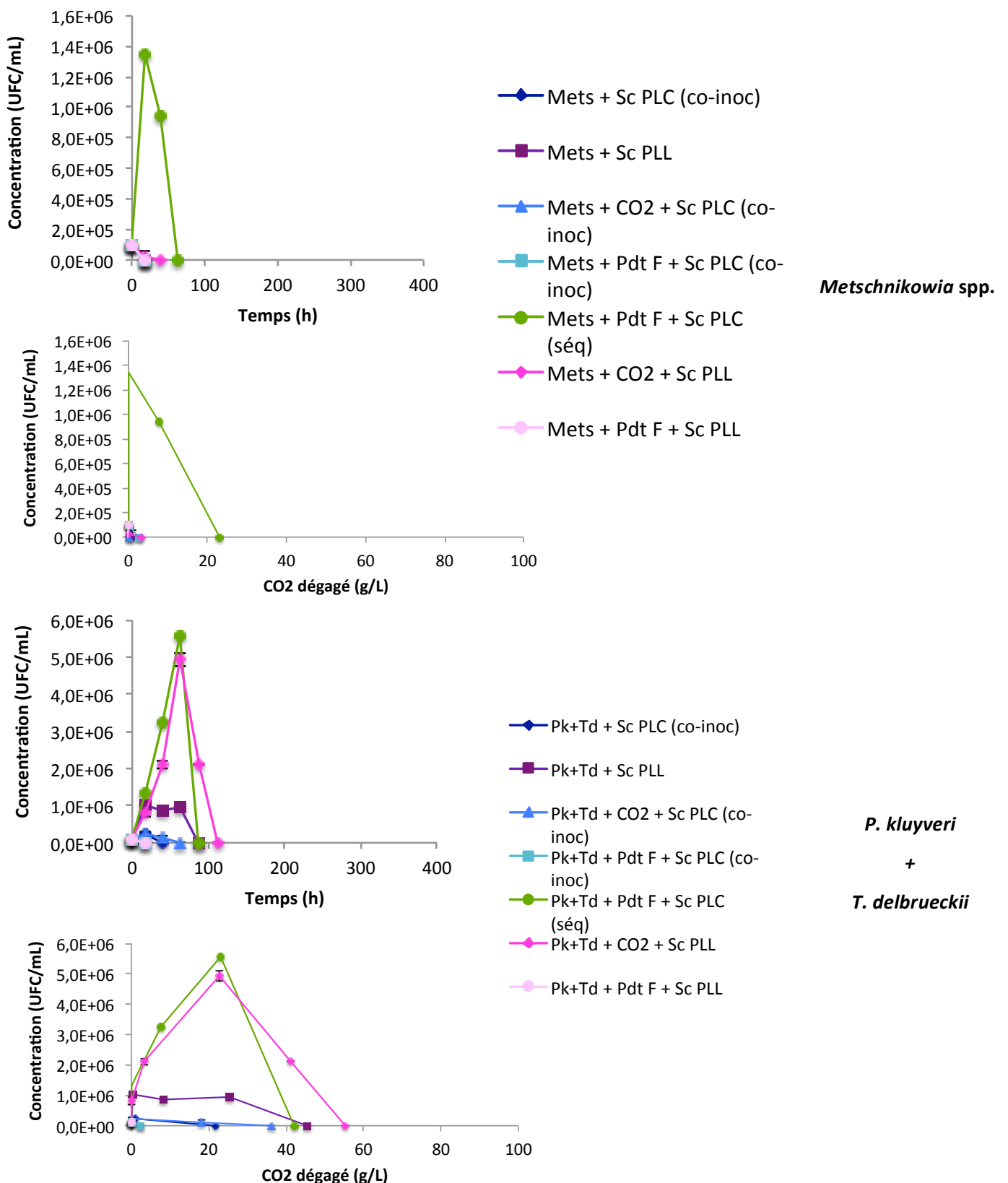
- **Cinétiques de croissance des levures non-Saccharomyces**

Tout d'abord, nous allons rechercher les combinaisons permettant de stimuler les espèces de non-*Saccharomyces* d'intérêt (*Metschnikowia* spp., *T. delbrueckii*, *P. kluyveri*). Les résultats sont présentés sur la figure 44.

Seule la supplémentation du moût avec le produit F et avec la souche *S. cerevisiae* PLC en inoculation séquentielle (Pdt F + Sc PLC séq) permet de stimuler la croissance de *Metschnikowia* spp. Dans ce cas, la population maximale est de  $1,4 \cdot 10^6$  UFC/mL pour un taux d'inoculation de  $1 \cdot 10^5$  UFC/mL. Cette même combinaison (Pdt F + Sc PLC séq) permet également une croissance plus importante de *P. kluyveri*/*T. delbrueckii* (non différenciées sur notre milieu de culture) pour atteindre une population maximale de  $5,6 \cdot 10^6$  UFC/mL. L'utilisation de la souche de *S. cerevisiae* à phase de latence longue permet aussi une croissance importante du couple *P. kluyveri*/*T. delbrueckii*, quand elles sont inoculées sans ou avec saturation en CO<sub>2</sub>. Dans ce dernier cas, la population du couple *P. kluyveri*/*T. delbrueckii* est alors plus élevée ( $5 \cdot 10^6$  UFC/mL contre  $10^6$  UFC/mL en absence de CO<sub>2</sub>). Ces résultats montrent que la saturation du moût en CO<sub>2</sub> stimule la croissance de ce couple. En culture pure, la croissance de *T. delbrueckii* était stimulée en présence de CO<sub>2</sub> contrairement à *P. kluyveri*. Ces observations permettent de supposer que *T. delbrueckii* a dominé *P. kluyveri* dans ces conditions.

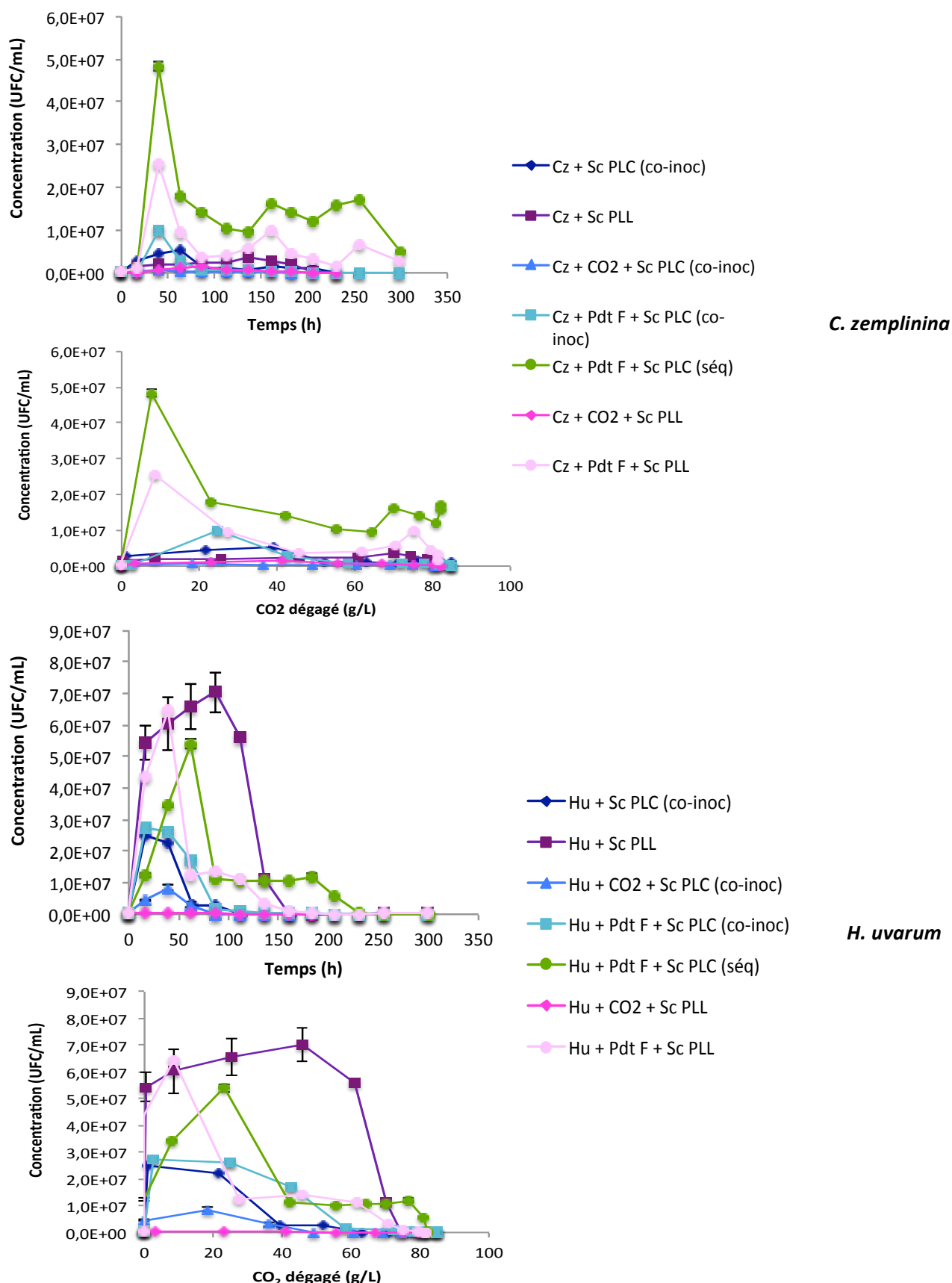
L'analyse des cinétiques de croissance a permis de mettre en évidence que 3 combinaisons permettent de stimuler les espèces de levures non-*Saccharomyces* d'intérêt :

- Produit F + *S. cerevisiae* PLC (inoculation séquentielle)
- *S. cerevisiae* PLL
- CO<sub>2</sub> + *S. cerevisiae* PLL



**Figure 44: Cinétiques de croissance des espèces de non-Saccharomyces d'intérêt en présence de *S. cerevisiae* et en fonction du facteur abiotique testé**

Taux d'inoculation : *H. uvarum* (Hu)  $3 \cdot 10^5$  cell viables/mL, *C. zemplinina* (Cz)  $10^5$  cell viables/mL, *Metschnikowia* spp. (Mets)  $10^5$  cell viables/mL, *T. delbrueckii* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *P. kluyveri* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *S. cerevisiae* (Sc)  $5 \cdot 10^5$  cell viables/mL. Les fermentations ont été effectuées en présence du mélange d'espèces non-Saccharomyces et de *S. cerevisiae*. Sc PLC : *S. cerevisiae* à phase de latence courte ; Sc PLL : *S. cerevisiae* à phase de latence longue ; co-inoc : *S. cerevisiae* a été inoculée en même temps que le mélange d'espèces non-Saccharomyces ; séq : *S. cerevisiae* a été inoculée 24h après le mélange d'espèces non-Saccharomyces (séquentiel). Dans le cas de Sc PLL, la co-inoculation a uniquement été effectuée. CO<sub>2</sub> : saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique ; Pdt F supplémentation du moût avec le produit commercial F. Pour chaque espèce, les résultats sont présentés en fonction du temps et du CO<sub>2</sub> dégagé.



**Figure 45: Cinétiques de croissances des espèces de non-*Saccharomyces* indésirables en présence de *S. cerevisiae* et en fonction du facteur abiotique testé**

Taux d'inoculation : *H. uvarum* (Hu)  $3 \cdot 10^5$  cell viables/mL, *C. zemplinina* (Cz)  $10^5$  cell viables/mL, *Metschnikowia* spp. (Mets)  $10^5$  cell viables/mL, *T. delbrueckii* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *P. kluyveri* (Td)  $5 \cdot 10^4$  cell viables/mL, *S. cerevisiae* (Sc)  $5 \cdot 10^5$  cell viables/mL. Les fermentations ont été effectuées en présence du mélange d'espèces non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae*. Sc PLC : *S. cerevisiae* à phase de latence courte ; Sc PLL : *S. cerevisiae* à phase de latence longue ; co-inoc : *S. cerevisiae* a été inoculée en même temps que le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* ; séq : *S. cerevisiae* a été inoculée 24h après le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* (séquentiel). Dans le cas de Sc PLL, la co-inoculation a uniquement été effectuée. CO<sub>2</sub> : saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique ; Pdt F supplémentation du moût avec le produit commercial F. Pour chaque espèce, les résultats sont présentés en fonction du temps et du CO<sub>2</sub> dégagé.

Nous allons maintenant étudier l'impact de ces différentes combinaisons sur le développement des espèces de non-*Saccharomyces* indésirables (*C. zemplinina* et *H. uvarum*, figure 45).

Le produit F a favorisé la croissance de *C. zemplinina*, indépendamment de la souche de *S. cerevisiae* utilisée et du mode d'inoculation. Les populations maximales pour ces trois modalités sont comprises entre  $10^7$  et  $5.10^7$  UFC/mL (taux d'inoculation  $10^5$  UFC/mL), mais ces niveaux de population chutent rapidement. Dans le cas de la modalité *S. cerevisiae* PLC (inoculation séquentielle) avec le produit F, la population s'est stabilisée autour de  $10^7$  UFC/mL jusqu'à 78 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé.

Enfin, concernant l'espèce *H. uvarum*, seule la combinaison CO<sub>2</sub> + *S. cerevisiae* PLL permet d'inhiber totalement sa croissance. Dans les autres modalités, ses populations maximales sont très variables, de  $8,4.10^6$  à  $7,2.10^7$  UFC/mL (taux d'inoculation  $3.10^5$  UFC/mL). En présence de *S. cerevisiae* à phase de latence longue, sa population maximale est la plus élevée et perdure jusqu'à 65 g de CO<sub>2</sub> dégagé.

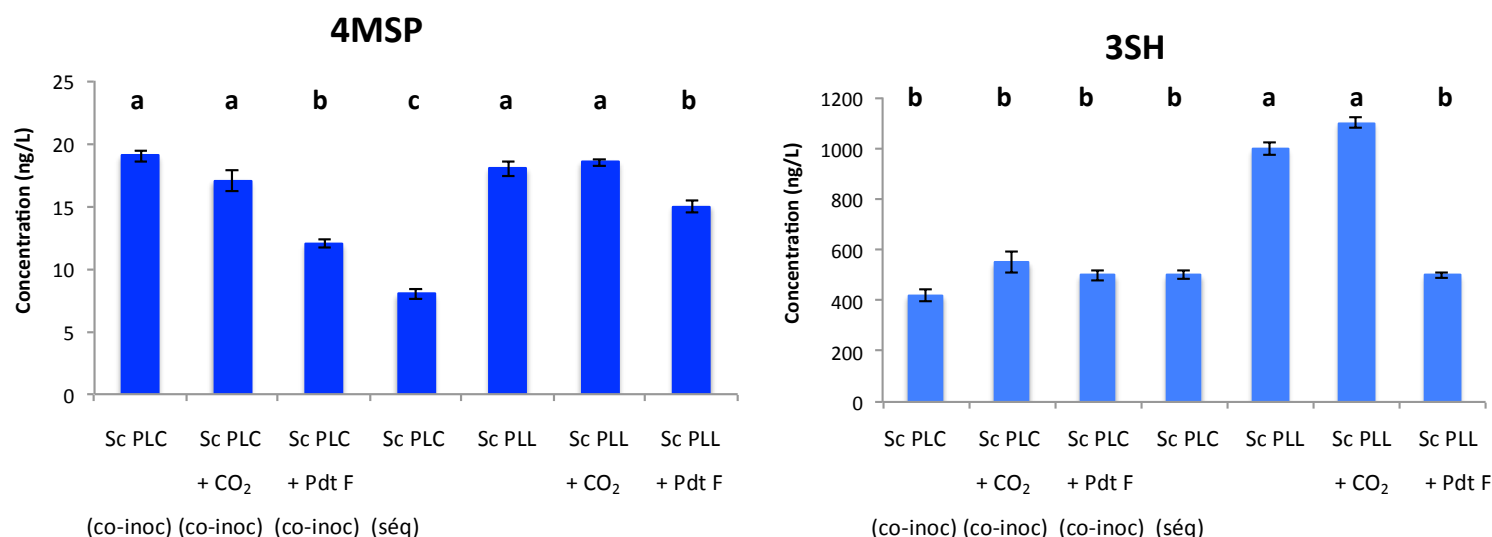
L'analyse des cinétiques de croissance des différentes espèces de levures non-*Saccharomyces* a permis de mettre en évidence que 3 combinaisons (Produit F + *S. cerevisiae* PLC (inoculation séquentielle), *S. cerevisiae* PLL et CO<sub>2</sub> + *S. cerevisiae* PLL). Or, parmi ces 3 combinaisons, 2 stimulent le développement de *C. zemplinina* et *H. uvarum* : Produit F + *S. cerevisiae* PLC (inoculation séquentielle) et *S. cerevisiae* PLL, elles sont donc écartées.

La combinaison restante (CO<sub>2</sub> + *S. cerevisiae* PLL) semble être la plus adaptée car elle stimule la croissance de *P. kluyveri*/*T. delbrueckii* et inhibe *C. zemplinina* et *H. uvarum*. Seule la croissance de *Metschnikowia* spp. n'est pas stimulée pour cette combinaison.



### 2.2.3.3 Thiols volatils

Le dosage des thiols volatils (4MSP et 3SH) a été effectué que sur les vins ayant des concentrations en sucres résiduels inférieures à 2 g/L.



**Figure 46: Concentration en thiols volatils des différentes combinaisons ayant permis une fermentation alcoolique complète**

Les fermentations ont été effectuées en présence du mélange d'espèces non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae*. Sc PLC : *S. cerevisiae* à phase de latence courte ; Sc PLL : *S. cerevisiae* à phase de latence longue ; co-inoc : *S. cerevisiae* a été inoculée en même temps que le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* ; séq : *S. cerevisiae* a été inoculée 24h après le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* (séquentiel). Dans le cas de Sc PLL, la co-inoculation a uniquement été effectuée. CO<sub>2</sub> : saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique ; Pdt F supplémentation du moût avec le produit commercial F.

Les concentrations en 4MSP les plus élevées ont été retrouvées dans les vins issus des combinaisons : Sc PLC (co-inoc), Sc PLL, CO<sub>2</sub> + Sc PLC (co-inoc) et CO<sub>2</sub> + Sc PLL.

La supplémentation du produit F n'a pas favorisé la libération du 4MSP. L'analyse de corrélations (coefficient de Spearman au seuil de 5%) a en effet mis en évidence une corrélation négative entre la quantité de 4MSP et la présence du produit F (- 0,98). En présence de ce produit, les concentrations finales sont diminuées de 34% dans le cas de l'utilisation de Sc PLC en co-inoculation et de 18% dans le cas de l'utilisation de Sc PLL. La plus faible concentration est retrouvée, en présence du produit F, lorsque Sc PLC a été inoculée en séquentielle (7µg/L).

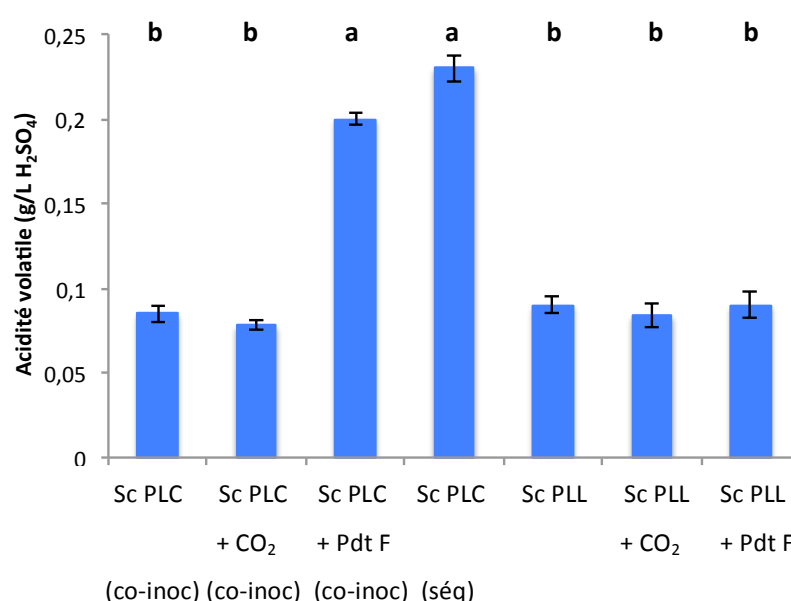
Les concentrations en 3SH les plus faibles sont retrouvées dans les vins issus des combinaisons suivantes : *S. cerevisiae* PLC (co-inoculation), CO<sub>2</sub> + *S. cerevisiae* PLC (co-inoculation), produit F + *S. cerevisiae* PLC (co-inoculation), produit F + *S. cerevisiae* PLC (inoculation séquentielle) et produit F

+ *S. cerevisiae* PLL. Les modalités impliquant Sc PLL avec ou sans saturation en CO<sub>2</sub> permettent d'obtenir les concentrations les plus élevées (908 et 1110 ng/L respectivement).

En conclusion, la libération des deux thiols volatils par la levure a été favorisée en présence de *S. cerevisiae* à phase de latence longue, avec ou sans saturation en CO<sub>2</sub>. La combinaison retenue au paragraphe précédent, permettant de stimuler *P.kluyveri*/*T. delbrueckii* tout en inhibant *C. zemplinina* et *H. uvarum* (*S. cerevisiae* PLL + CO<sub>2</sub>) fait partie de ces modalités.

#### 2.2.3.4 Acidité volatile

L'acidité volatile a été dosée dans les vins dont la concentration en sucres résiduels était inférieure à 2 g/L.



**Figure 47: Acidité volatile pour les différentes modalités testées**

Les fermentations ont été effectuées en présence du mélange d'espèces non-*Saccharomyces* et de *S. cerevisiae*. Sc PLC : *S. cerevisiae* à phase de latence courte ; Sc PLL : *S. cerevisiae* à phase de latence longue ; co-inoc : *S. cerevisiae* a été inoculée en même temps que le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* ; séq : *S. cerevisiae* a été inoculée 24h après le mélange d'espèces non-*Saccharomyces* (séquentiel). Dans le cas de Sc PLL, la co-inoculation a uniquement été effectuée. CO<sub>2</sub> : saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique ; Pdt F supplémentation du moût avec le produit commercial F.

Les plus fortes productions d'acidité volatile (figure 47) sont obtenues pour les modalités impliquant le produit F et la souche à phase de latence courte de *S. cerevisiae* (0,2 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). En effet, l'analyse de corrélations (coefficient de Spearman au seuil de 5%) a mis en évidence une corrélation positive entre la quantité d'acidité volatile et la présence du produit F (+ 0,76) lorsque *S. cerevisiae* PLC a été utilisée en co-inoculation ou en séquentiel. Les autres modalités sont caractérisées par des concentrations plus faibles en acidité volatile comprises entre 0,08 et 0,1 g/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## 2.3 Discussion

La proportion entre les levures de l'espèce *S. cerevisiae* et les autres genres de levure du moût varie en fonction de différents facteurs. Cependant, les non-*Saccharomyces* sont généralement majoritaires et les premières heures de la fermentation alcoolique sont propices pour les isoler et les détecter (Combina et al., 2005; Fleet, 2003; Heard and Fleet, 1985; Jolly et al., 2003a; Li et al., 2010; Martini et al., 1996; Povhe Jemec et al., 2001). Les levures appartenant aux genres *Hanseniaspora* et *Candida*, particulièrement les espèces *H. uvarum* et *C. zemplinina*, sont majoritairement isolées et peuvent représenter jusqu'à 90% de la population totale. L'espèce *Metschnikowia pulcherrima* est traditionnellement présente dans les moûts à des niveaux de populations inférieurs aux genres précédents (2-10% de la population totale). Enfin, de nombreuses espèces de levures minoritaires peuvent également être isolées des moûts parmi lesquelles : *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*... La population de levures totales retrouvée dans les moûts est généralement comprise entre  $10^4$  et  $10^6$  UFC/mL (Baleiras Couto et al., 2005; Combina et al., 2005; Fleet, 2003; Li et al., 2010; Zott et al., 2008).

Depuis quelques années, de nombreuses études se sont intéressées aux facteurs influençant le développement des levures non-*Saccharomyces* retrouvées dans les moûts (Andorra et al., 2011; Mendoza et al., 2008; Pretorius, 2000). Néanmoins, la plupart des travaux réalisés étudient le comportement des levures en cultures pures ou en co-inoculation avec *S. cerevisiae* mais rarement dans un mélange complexe de différentes espèces.

Dans ce travail, nous avons reconstitué un mélange de 5 espèces de levures non-*Saccharomyces* isolées fréquemment des moûts. Les taux d'inoculation choisis pour les 5 espèces permettent de recréer les proportions retrouvées dans les moûts : *H. uvarum* ( $3 \cdot 10^5$  cell/viables mL, soit 50% de la population), *C. zemplinina* ( $10^5$  cell viables/ mL, soit 17%), *Metschnikowia* spp. ( $10^5$  cell viables/ mL, soit 17%), *T. delbrueckii* ( $5 \cdot 10^4$  UFC/mL, soit 8%) et *P. kluyveri* ( $5 \cdot 10^4$  UFC/mL, soit 8%). Deux souches de *S. cerevisiae*, une à phase de latence longue et une à phase de latence courte, ont été ajoutées à ce dispositif expérimental.

- **Cultures pures**

Dans une première partie, deux facteurs environnementaux ont été sélectionnés du fait de leur capacité à:

- stimuler la croissance de espèces de levures non-*Saccharomyces* d'intérêt de notre mélange (*T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp., *P. kluyveri*)

- inhiber les espèces indésirables (*C. zemplinina* et *H. uvarum*)
- ralentir la croissance de *S. cerevisiae* tout en assurant le bon déroulement de la fermentation alcoolique

Ces deux facteurs sont la saturation du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation alcoolique et la supplémentation du moût avec le produit commercial, à base de dérivés de levure (produit F).

#### ○ **Impact de la saturation du moût en CO<sub>2</sub> sur la croissance des levures**

Lors de la saturation du moût en CO<sub>2</sub> (1,2 g/L), la croissance de *C. zemplinina*, *H. uvarum* et *P. kluyveri* a été fortement inhibée, alors que celle de *T. delbrueckii* et *Metschnikowia* spp. a été stimulée. Un ralentissement de la croissance des deux souches de *S. cerevisiae* a également été observé, sans perturber la fin de la fermentation alcoolique.

Le CO<sub>2</sub> est connu pour son effet antimicrobien. La présence de CO<sub>2</sub> dans le milieu entraîne une acidification du fait de sa dissociation en ions bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonate (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) et hydrogène (H<sup>+</sup>). Le CO<sub>2</sub> est capable par diffusion simple de pénétrer à travers la membrane plasmique et de s'y accumuler entraînant des modifications structurales et fonctionnelles au sein de la membrane. Le CO<sub>2</sub> et ses formes dissociées entraînent une acidification intracellulaire qui altère le fonctionnement des enzymes. L'accumulation du CO<sub>2</sub> inhibe les réactions de décarboxylation mais stimule aussi celles de carboxylation (Castelli et al., 1969; Garcia-Gonzalez et al., 2007; Haas et al., 1989; Hutkins and Nannen, 1993; Jones and Greenfield, 1982; Lin et al., 1994; Okamoto, 1976; Spilimbergo et al., 2005).

En 2005, Gunes et al., (2005) avaient étudié l'effet de CO<sub>2</sub> préssurisé sur le développement de *S. cerevisiae*, *H. uvarum* et *C. stellata* mettant en évidence des différences de sensibilité, entre les espèces. Les différentes espèces étaient inoculées dans du jus de raisin puis soumises à différentes pressions et concentrations en CO<sub>2</sub> durant 5 minutes. Après 1h d'incubation, le dénombrement de chaque espèce a été effectué. Ainsi, à 25°C et à la plus faible pression testée (6,9 MPa soit près de 70 fois la pression atmosphérique), *S. cerevisiae* présentait la meilleure résistance suivie de *C. stellata* puis *H. uvarum*. Dans nos conditions expérimentales (en saturant le moût sans être ne surpression), nous avons également pu mettre en évidence des différences de comportement vis à vis du CO<sub>2</sub> en fonction des espèces. Ainsi, *H. uvarum* et *P. kluyveri* sont les espèces les plus affectées par la présence de CO<sub>2</sub> avec une forte inhibition de leur croissance (diminution de la vitesse de croissance et de la population maximale, augmentation du taux de mortalité) et une diminution de la vitesse maximale de fermentation et capacité fermentaire (quantité maximale de CO<sub>2</sub> dégagé). La

croissance de *S. cerevisiae* et *C. zemplinina* est affectée mais de façon moins marquée. *C. zemplinina* présente cependant une sensibilité plus élevée avec une augmentation du taux de mortalité et une diminution de la vitesse et la capacité fermentaire en présence de CO<sub>2</sub> ce qui n'est pas le cas pour *S. cerevisiae*.

De façon intéressante, deux espèces étaient stimulées en présence de CO<sub>2</sub> : *T. delbrueckii* et *Metschnikowia* spp. Si le CO<sub>2</sub> peut avoir un effet inhibiteur, il est également indispensable à la croissance microbienne (Rockwell and Highberger, 1927). Il joue le double rôle de substrat des réactions de carboxylation et de produit des réactions de décarboxylation au sein du métabolisme cellulaire. Ces réactions jouent un rôle majeur lors de la néoglucogenèse et lors de la synthèse des acides nucléiques, des acides tricarboxyliques du cycle de Krebs et de certains acides aminés. Les produits résultant de sa dissociation sont également impliqués dans des réactions métaboliques. Particulièrement, l'ion bicarbonate est nécessaire au fonctionnement de certaines enzymes et notamment l'acétyl-CoA carboxylase et la phosphoenolpyruvate carboxylase. Chez les levures, l'anhydrase carbonique permet l'interconversion du CO<sub>2</sub> en bicarbonate (Aguilera et al., 2005; Ueda et al., 2008). Les levures exprimant cette enzyme peuvent générer suffisamment de bicarbonate pour leur croissance à partir de faibles concentrations en CO<sub>2</sub>. En revanche, si l'anhydrase carbonique est peu ou pas exprimée, la croissance est fortement inhibée si le milieu n'est pas supplémenté en ions bicarbonate, ou en CO<sub>2</sub>. En effet, la dissociation naturelle du CO<sub>2</sub> permet de libérer des ions bicarbonates dans le milieu. Chez les espèces *T. delbrueckii* et *Metschnikowia* spp., une augmentation de la quantité d'acides gras cellulaires a été observée en présence de CO<sub>2</sub> par rapport à la modalité témoin (tableau 19). La composition lipidique initiale du moût étant identique (saturé ou pas en CO<sub>2</sub>), l'augmentation de la quantité de lipides est bien le résultat chez ces espèces d'un métabolisme plus actif de la levure pouvant être lié à une meilleure activité de l'acétyl-CoA carboxylase nécessaire à la formation de malonyl-CoA à la base de la biosynthèse des acides gras. La stimulation de la croissance de *T. delbrueckii* et *Metschnikowia* spp. lorsque le milieu est saturé en CO<sub>2</sub> pourrait être expliquée par un dysfonctionnement de l'anhydrase carbonique.

- ***La saturation du moût en CO<sub>2</sub> diminue la capacité fermentaire des levures non-Saccharomyces***

Une diminution de la capacité fermentaire en présence de CO<sub>2</sub> a été observée pour toutes les levures non-*Saccharomyces* même si elle n'implique pas toujours une inhibition de la croissance. C'est le cas pour les espèces *T. delbrueckii* et *M. pulcherrima* (croissance stimulée). Ce découplage entre croissance et fermentation peut être expliqué par la faible concentration en oxygène dissout

disponible au cours de la fermentation alcoolique. En effet, l'oxygène est indispensable à la biosynthèse des acides gras insaturés et des stérols à partir du squalène (précurseur), constituants principaux de la membrane plasmique (Larue et al., 1980; Pfisterer et al., 1977; Strydom et al., 1982). Plusieurs études ont mis en évidence qu'au cours de la fermentation alcoolique, la composition lipidique de la membrane plasmique de la levure évolue, notamment du fait de l'accumulation d'éthanol dans le milieu qui est corrélée à l'augmentation de la proportion d'acides gras insaturés chez la levure *S. cerevisiae* (Agudo, 1992; Alexandre et al., 1994; Beaven et al., 1982; Ghareib et al., 1988; Mishra and Kaur, 1991; Mishra and Prasad, 1989; Šajbidor and Grego, 1992; Thomas et al., 1978; Walker-Caprioglio et al., 1990; You et al., 2003) et chez la levure *H. guilliermondii* (Pina et al. 2004). Ces auteurs ont en effet mis en évidence que l'augmentation de la proportion d'acide oléique et d'ergostérol était bien corrélée à une augmentation de la résistance à l'éthanol chez *H. guilliermondii* mais pas pour *H. uvarum* et *T. delbrueckii*. Si la biosynthèse de ces composés, acides gras insaturés et stérols, est moins efficace du fait de la faible concentration en oxygène dissout, la résistance à l'éthanol des levures peut être diminuée et donc leur capacité fermentaire réduite.

Les variations observées en présence de CO<sub>2</sub> par rapport à la modalité témoin au niveau de la composition en acides gras insaturés (tableau 17) et stérols (tableau 18), semblent confirmer cette hypothèse. En effet, en présence de CO<sub>2</sub>, nous avons constaté une diminution de la proportion d'acides gras insaturés (AGI/AGS) chez *C. zemplinina* et *Metschnikowia* spp. et une diminution de la quantité totale de stérols chez *C. zemplinina*, *T. delbrueckii*, *H. uvarum* et *P. kluyveri*. L'analyse des corrélations a révélé que la capacité fermentaire des non-*Saccharomyces* était corrélée à la quantité totale de stérols chez *C. zemplinina* et *H. uvarum*, à la proportion d'ergostérol chez *T. delbrueckii*, à la proportion d'acides gras insaturés chez *Metschnikowia* spp., et enfin à la proportion de squalène chez *P. kluyveri*. Ces résultats soulignent que la capacité fermentaire des non-*Saccharomyces* était liée à leur composition lipidique ce qui n'a pas été observé chez les deux souches de *S. cerevisiae* dans nos conditions expérimentales.

○ ***La supplémentation du produit commercial F modifie le comportement des levures au cours de la fermentation et leur composition lipidique***

L'impact de la supplémentation du produit F a été très variable selon les espèces. Sa supplémentation au début de la fermentation a ralenti la croissance de *S. cerevisiae* en diminuant la vitesse maximale de croissance (*S. cerevisiae* à phase de latence longue) et la capacité biotique pour les deux souches de *S. cerevisiae*, sans impacter leur capacité fermentaire. Cette supplémentation a

également ralenti la croissance des espèces de non-*Saccharomyces* indésirables (*C. zemplinina* et *H. uvarum*) en diminuant leur vitesse maximale de croissance et retarde le démarrage de la fermentation (augmentation de la durée de la phase de latence de fermentation). La présence du produit F permet d'augmenter la vitesse maximale de croissance de *Metschnikowia* spp. et de diminuer sa mortalité. Enfin, malgré une diminution de leur vitesse maximale de croissance, l'enrichissement du moût avec le produit F permet d'augmenter la capacité biotique de *T. delbrueckii* et *P. kluyveri* et de diminuer leur taux de mortalité.

L'ajout du produit commercial F permet de supplémenter le moût en acides gras insaturés (acides palmitoléique C16 :1 et oléique C18 :1), en zymostérol et ergostérol, ainsi qu'en acides gras saturés (acide palmitique C16 et stéarique C18). L'analyse de la composition lipidique des cellules en fin de fermentation en présence du produit F a permis de mettre en évidence des variations par rapport à la modalité témoin (sans supplémentation), suggérant que les lipides du produit ont bien été assimilés. Ces résultats confirment des études antérieures montrant que les levures, y compris les non-*Saccharomyces*, sont capables d'assimiler les lipides exogènes au cours de la fermentation alcoolique (Beltran et al., 2008; Landolfo et al., 2010; Luparia et al., 2004; Pina et al., 2004; Redón et al., 2009; Rodriguez et al. 1982; Torija et al., 2003).

Chez *T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp. et *C. zemplinina* une diminution de la quantité d'acides gras a été observée en présence du produit F. Une diminution de la quantité de stérols (hors squalène) a également été observée chez *C. zemplinina* et *S. cerevisiae*. Ce phénomène avait déjà été observé par Redón et al. (2009), qui avaient mis en évidence une diminution de la quantité totale de lipides membranaires de *S. cerevisiae* lorsque le moût est supplémenté en lipides exogènes. Une diminution de la proportion d'acides gras insaturés a été observée chez *Metschnikowia* spp., *C. zemplinina*, *P. kluyveri* et *S. cerevisiae*. L'analyse des corrélations a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre la diminution de la capacité biotique de *S. cerevisiae* observée en présence du produit F et la proportion des acides gras mono-insaturés (MUFA) et le rapport AGI/AGS.

La présence du produit F a contribué à augmenter la proportion en ergostérol chez *S. cerevisiae* ce qui n'est pas le cas chez *C. zemplinina*. En effet chez cette dernière le zymostérol a préférentiellement été incorporé. Cette augmentation de la proportion en zymostérol chez *C. zemplinina* est corrélée positivement à l'augmentation du taux de mortalité et la diminution de la capacité fermentaire. Chez *S. cerevisiae*, la diminution de la capacité biotique était corrélée à l'augmentation de la proportion en phytostérols. Ces résultats confirment des travaux précédents

ayant mis en évidence que l'accumulation phytostérols avaient un impact sur la croissance de *S. cerevisiae* et pouvaient même conduire à des arrêts de fermentation (Luparia et al., 2004; Rozes, 1992). Chez cette espèce nous avons montré qu'il existe aussi une corrélation entre la proportion de squalène et le taux de mortalité.

Si une diminution de la quantité de totale stérols a été observée chez *C. zemplinina* et *S. cerevisiae*, une augmentation a été mise en évidence chez les autres espèces : *T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp., *P. kluyveri* et *H. uvarum*. Chez *T. delbrueckii*, une augmentation de la proportion de l'ergostérol est corrélée à l'augmentation de la capacité fermentaire de cette espèce. Chez *P. kluyveri*, la vitesse maximale de croissance, qui diminue fortement en présence du produit F est corrélé négativement à la proportion de squalène.

Il est important de noter que le produit F est un dérivé à base de levure. Si ce produit est riche en lipides, sa supplémentation dans le moût apporte également d'autres nutriments essentiels pour la croissance (oligo-éléments, minéraux, vitamines...). La composition lipidique du produit F ne permet pas donc d'expliquer toutes les variations observées au niveau des paramètres de croissance et de fermentation.

- **Cultures mixtes**

- ***Le choix de la souche de *S. cerevisiae* et le moment d'inoculation impactent le développement des levures non-Saccharomyces***

La co-inoculation avec la souche *S. cerevisiae* à phase de latence courte a limité fortement le développement levures des non-*Saccharomyces*. Cette inhibition a déjà été observée par de nombreux auteurs. Différents mécanismes d'interactions peuvent être impliqués en fonction des espèces expliquant la dominance de *S. cerevisiae* : compétition pour les nutriments, production de composés toxiques, effet densité, cell-cell contact... (Fleet, 2003; Holm Hansen et al., 2001; Nissen and Arneborg, 2003; Nissen et al., 2003; Renault et al., 2013; Strehaiano et al., 2008). De plus, du fait de sa capacité à démarrer rapidement la fermentation alcoolique (moins 20h), on peut penser que le CO<sub>2</sub> dégagé au début de la réaction, qui entraîne une saturation, pourrait aussi contribuer à ces inhibitions. *C. zemplinina*, *H. uvarum* et *P. kluyveri* qui présentaient une forte sensibilité au CO<sub>2</sub> en culture pure pourraient donc être inhibées. Dans le cas de la saturation du milieu en CO<sub>2</sub> via le métabolisme de *S. cerevisiae*, cette saturation est plus lente (quelques heures) contrairement à nos



conditions expérimentales où elle était obtenue en 7 minutes par ajout de CO<sub>2</sub> gazeux exogène, ce qui constitue un stress plus important.

Lorsque la même souche de *S. cerevisiae* est utilisée en inoculation séquentielle (addition 24h après le mélange de levures non-*Saccharomyces*), une meilleure croissance de toutes les espèces de non-*Saccharomyces* a été observée, puis leur population chute dès que *S. cerevisiae* commence sa croissance. En inoculation séquentielle, les espèces *H. uvarum*, *P.kluyveri*/*T. delbrueckii* et *C. zemplinina* présentaient une croissance plus importante que celle de *Metschnikowia* spp. Ces quatre premières espèces ayant les vitesses de croissance les plus élevées en culture pure (0,21, 0,18, 0,14 et 0,13 UFC/mL/h, annexe 2) ont donc été favorisées lors de l'inoculation tardive de *S. cerevisiae*. Cependant, l'inoculation séquentielle de la souche à phase de latence courte de *S. cerevisiae* n'a pas permis de terminer la fermentation dans nos conditions. Cet arrêt était sûrement dû au développement important des levures non-*Saccharomyces* et donc à l'épuisement du milieu en nutriments indispensables à *S. cerevisiae*.

L'utilisation de la souche à phase de latence longue de *S. cerevisiae* a permis à la fois de stimuler le développement des levures non-*Saccharomyces* (*H. uvarum* et *P.kluyveri*/*T. delbrueckii*) et d'achever la fermentation alcoolique. Cependant, une croissance plus importante de *H.uvarum* (espèce non désirée) a été observée en présence de *S. cerevisiae* à phase de latence longue, par rapport aux autres modalités. Cette forte croissance de *H. uvarum* ( $7,2 \cdot 10^7$  UFC/mL) en présence de *S. cerevisiae* à phase de latence longue pourrait être expliquée par le métabolisme soufré spécifique de cette dernière. En effet *S. cerevisiae* à phase de latence longue possède une pompe à sulfites permettant de relarguer le SO<sub>2</sub> dans le milieu déficiente contrairement à la souche *S. cerevisiae* à phase de latence courte (Zimmer, 2013). Cette souche est alors capable d'incorporer le SO<sub>2</sub> libre dans sa cellule mais pas de le faire ressortir. La conséquence directe de ce dysfonctionnement est une diminution de la concentration en SO<sub>2</sub> libre dans le milieu, ce qui est favorable pour *H.uvarum*, connue pour être sensible au SO<sub>2</sub> (Albertin et al., 2014a).

- **La supplémentation du moût avec le produit F favorise le développement de *C. zemplinina* et *H. uvarum***

Nous avons pu constater que indépendamment de la souche de *S. cerevisiae* et du mode d'inoculation, le démarrage de la fermentation alcoolique est systématiquement plus rapide en présence du produit F seul. Cela est expliqué par le fait que le produit F stimule le développement de deux espèces de levures non-*Saccharomyces* qui vont initier la fermentation alcoolique : *C. zemplinina* et *H. uvarum*. Concernant *S. cerevisiae*, la supplémentation du produit F a entraîné

une chute de viabilité plus importante de la souche à phase de latence courte et un ralentissement de la phase de latence de la souche à phase de latence longue, sans toutefois perturber le déroulement de la fermentation alcoolique.

- ***La saturation du moût en CO<sub>2</sub> associée à l'utilisation de la souche *S. cerevisiae* à phase de latence longue favorise le développement des espèces non-Saccharomyces d'intérêt : *P. kluyveri*/*T. delbrueckii****

Parmi les douze combinaisons testées, associant la nature de la souche de *S. cerevisiae*, le mode d'inoculation, la saturation du moût en CO<sub>2</sub> et la supplémentation avec le produit F, deux combinaisons ont permis de favoriser les espèces de levure non-*Saccharomyces* d'intérêt. Il s'agit des modalités : *S. cerevisiae* à phase de latence longue avec et sans saturation en CO<sub>2</sub>. Cependant, l'utilisation de la souche de *S. cerevisiae* à phase de latence longue sans saturation du milieu en CO<sub>2</sub> a également favorisé les espèces indésirables *C. zemplinina* et *H. uvarum*.

La combinaison retenue (CO<sub>2</sub> + *S. cerevisiae* à phase de latence longue) a permis de stimuler *P. kluyveri*/*T. delbrueckii* (espèces non différenciées sur milieu WL) mais pas *Metschnikowia* spp. En effet, en culture pure, cette dernière, est caractérisée par une vitesse maximale de croissance plus faible que les autres espèces ce qui la défavorise. En culture pure, la croissance de *T. delbrueckii* était stimulée en présence de CO<sub>2</sub> contrairement à *P. kluyveri*. Ces observations permettent de supposer que *T. delbrueckii* a dominé *P. kluyveri* dans ces conditions.

La concentration du 3SH des vins en présence de *S. cerevisiae* à phase de latence longue, avec ou sans saturation en CO<sub>2</sub>, a été augmentée par rapport aux autres modalités. En effet, on peut noter que la concentration finale en 3SH, dans le cas de la modalité *S. cerevisiae* à phase de latence longue avec saturation en CO<sub>2</sub>, a doublé par rapport à la même modalité avec la souche à phase de latence courte (1111 ng/L avec Sc PLL et 547 ng/L avec Sc PLC). La stimulation de la croissance des espèces *P. kluyveri*/*T. delbrueckii* peut expliquer cette forte augmentation. En effet ces deux espèces sont connues pour libérer des quantités importantes de thiols volatils (Anfang et al., 2009; Sadoudi et al., 2012; Zott et al., 2011). De plus, comme nous l'avons évoqué précédemment, la souche *T. delbrueckii* Alpha est capable de métaboliser des quantités très importantes de précurseur glutathionylé. Cela se traduit par une augmentation du relargage du précurseur cystéinylé dans le milieu extracellulaire (issu de la dégradation de la forme glutathionylée), qui pourra être métabolisé par *S. cerevisiae*, expliquant probablement l'augmentation de la libération de 3SH en fin de fermentation alcoolique.

# Conclusion générale et perspectives

La première partie de ce travail avait pour objectif de mieux comprendre les phénomènes d'interactions lors de l'utilisation de multi-starters (*S. cerevisiae* et les levures non-*Saccharomyces*) au cours de la fermentation alcoolique, en prenant comme modèle le couple *Torulaspora delbrueckii* Alpha/*Saccharomyces cerevisiae* X5. Les deux souches de cette étude sont commercialisées par la société Laffort qui a financé ce travail. Dans la deuxième partie, nous avons étudié l'incidence de deux facteurs environnementaux sur le développement de la communauté de levures non-*Saccharomyces*.

Afin d'étudier les interactions entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, l'ensemble des fermentations a été réalisé en fermenteur double compartiment, développé récemment au laboratoire (Renault et al., 2013). Les deux compartiments sont séparés par une membrane centrale permettant le passage du milieu mais pas des microorganismes, l'homogénéisation rapide du milieu entre les deux compartiments étant assurée par un système de pompe péristaltique. La régulation de la température et le suivi de la cinétique de fermentation se font de manière automatisée et des prélèvements réguliers ont permis d'effectuer le suivi des populations. Cet outil a permis de confirmer l'existence d'un phénomène de type « cell-cell contact » entre *T. delbrueckii* et *S. cerevisiae*, déjà évoqué lors d'études précédentes (Ciani and Comitini, 2015; Fleet, 2003; Nissen and Arneborg, 2003; Nissen et al., 2003; Renault et al., 2013), les deux espèces n'ayant pas un comportement similaire avec ou sans séparation. De plus, par rapport aux cultures pures de *S. cerevisiae*, une diminution de la concentration en 4MSP a été observée dans les cultures mixtes et une augmentation de 3SH lorsque les deux espèces sont cultivées séparément. Enfin, la présence de *T. delbrueckii* permet également d'augmenter la note fruitée des vins du fait de l'augmentation de certains esters mineurs tels que le propanoate d'éthyle, le dihydrocinnamate d'éthyle et l'isobutanoate d'éthyle, confirmant les travaux récents de Renault et al. (soumis), avec le même couple de souches.

Afin de mieux comprendre ces phénomènes d'interactions, une analyse protéomique est en cours. Elle devrait permettre de déterminer quelles familles ou voies métaboliques sont affectées par la séparation. L'analyse des protéines impliquées dans le stress ou l'apoptose fera l'objet d'une attention particulière.

Dans une deuxième partie, dans un contexte où de plus en plus d'oenologues ont fait le choix de revenir à des fermentations spontanées, en limitant l'utilisation de levures exogènes, une

meilleure connaissance des facteurs environnementaux influençant le développement des levures *S. cerevisiae* et non-*Saccharomyces* dans un mélange est nécessaire. Dans ce travail, l'impact de la saturation en CO<sub>2</sub> et de la supplémentation du moût avec un produit commercial à base de dérivé de levure (produit F) sur la croissance de cinq espèces de levures non-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii*, *Metschnikowia* spp., *P. kluyveri*, *C. zemplinina* et *H. uvarum*) a été étudié, en culture pure puis en mélange. A ce dispositif deux levures *S. cerevisiae* ont été ajoutées : l'une ayant une aptitude à démarrer rapidement la fermentation alcoolique (à phase de latence courte) et l'autre à phase de latence longue.

Ces deux facteurs, étudiés séparément, ont permis de ralentir la croissance de *S. cerevisiae* et celle de deux espèces indésirables *C. zemplinina* et *H. uvarum*.

Le CO<sub>2</sub> permet de stimuler la croissance de *T. delbrueckii* et *Metschnikowia* spp. et inhibe celle de *P. kluyveri*. Une diminution de la capacité fermentaire de toutes les espèces de levures non-*Saccharomyces* a été observée en présence de CO<sub>2</sub>, probablement liée à la diminution de la proportion d'acides gras insaturés et/ou de la quantité de stérols, susceptibles d'être impliqués dans la résistance à l'éthanol. Concernant *S. cerevisiae*, sa capacité fermentaire n'a pas été impactée.

La supplémentation du produit F a permis quant à elle de stimuler le démarrage de la croissance de *Metschnikowia* spp. et d'améliorer la survie de *T. delbrueckii* et *P. kluyveri*. Une grande variabilité est observée au niveau de la composition lipidique cellulaire des levures non-*Saccharomyces*. Des corrélations positives ou négatives, ont été observées entre certains paramètres de croissance et de fermentation et la composition lipidique cellulaire des levures. Cela concerne toutes les espèces de levures non-*Saccharomyces* étudiées et l'espèce *S. cerevisiae*.

Nous avons également montré que l'utilisation d'une souche de *S. cerevisiae* à phase de latence longue, en présence des cinq espèces de levures non-*Saccharomyces* permettait à la fois de stimuler la croissance de ces dernières (par rapport à l'utilisation d'une souche de *S. cerevisiae* à phase de latence courte), tout en sécurisant la fermentation alcoolique. Par contre, l'utilisation de la souche de *S. cerevisiae* à phase de latence courte en inoculation séquentielle conduit généralement à des arrêts de fermentation, du fait du développement important des levures non-*Saccharomyces* (forte compétition pour les nutriments, production de composés toxiques...). En présence de la souche *S. cerevisiae* à phase de latence longue, sans saturation du moût en CO<sub>2</sub>, nous avons observé une croissance importante de l'espèce *H. uvarum*. Cela peut s'expliquer par le fait que la souche *S. cerevisiae* à phase de latence longue possède une pompe à sulfites déficiente et donc rejette peu de SO<sub>2</sub> dans le milieu. Dans ces conditions *H. uvarum*, une espèce sensible au SO<sub>2</sub> libre dans le moût, est favorisée. De plus, d'autres auteurs ont suggéré que *H. uvarum* était capable de maintenir une

population élevée jusqu'à ce que *S. cerevisiae* atteigne une certaine densité de population. D'autres investigations sont nécessaires pour vérifier ces deux hypothèses.

Enfin, l'utilisation de la souche à phase de latence longue de *S. cerevisiae* couplée à la saturation rapide du moût en CO<sub>2</sub> avant le démarrage de la fermentation a permis à la fois de stimuler *P.kluyveri*/*T. delbrueckii*, espèces présentant un intérêt en œnologie (production de thiols volatils, d'esters impliqués dans la note fruitée des vins...) tout en inhibant *C. zemplinina* et *H. uvarum*, espèces pouvant impacter négativement la qualité du vin (production de composés soufrés, d'acétate d'éthyle, d'acide acétique...). L'analyse des thiols volatils a permis également de souligner l'intérêt de cette combinaison (inoculation avec *S. cerevisiae* à phase de latence longue dans un moût saturé en CO<sub>2</sub>). En effet, dans ces conditions, la concentration finale en 3SH dans les vins a doublé par rapport à la même modalité avec la souche à phase de latence courte (1111 ng/L avec Sc PLL et 547 ng/L avec Sc PLC). Cette augmentation est expliquée par la stimulation de *P.kluyveri*/*T. delbrueckii*, deux espèces fortes productrices de thiols.

Enfin, afin de mieux comprendre l'impact du CO<sub>2</sub>, notamment lors de la stimulation de *T. delbrueckii* et *Metschnikowia* spp., il serait intéressant d'étudier l'incidence de la supplémentation du milieu en ions bicarbonates, afin de déterminer si la présence de CO<sub>2</sub> dans le milieu permet à la levure de pallier à un dysfonctionnement de l'anhydrase carbonique, enzyme qui effectue l'interconversion du CO<sub>2</sub> en bicarbonate. Les ions bicarbonates sont en effet nécessaires au fonctionnement de certaines enzymes et notamment l'acétyl-CoA carboxylase ou la phosphoenolpyruvate carboxylase.

Ces travaux de thèse ouvrent de nombreuses perspectives.

En effet nous confirmons qu'il existe des interactions de type « cell-cell contact » entre les espèces *S. cerevisiae* et *T. delbrueckii*. Une meilleure connaissance de ces interactions, à l'issue de l'analyse protéomique, devrait permettre dans l'avenir de mieux gérer les fermentations alcooliques lors de l'utilisation de ces deux espèces (multi-starters).

Ces travaux montrent également sur un mélange de cinq espèces levures non-*Saccharomyces* qu'il est possible en modifiant des facteurs environnementaux d'impacter la communauté de levures non-*Saccharomyces*. Le choix de la souche de *S. cerevisiae* et le moment d'inoculation sont également des paramètres à prendre en considération. Une meilleure connaissance des besoins nutritionnels des levures non-*Saccharomyces*, notamment des espèces présentant un intérêt, est devenue indispensable.

## Références bibliographiques

---

Agudo, L. del C. (1992). Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 647–651.

Aguilera, F., Peinado, R., Millan, C., Ortega, J., and Mauricio, J. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H<sup>+</sup>-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology* 110, 34–42.

Aguilera, J., Van Dijken, J.P., De Winde, J.H., and Pronk, J.T. (2005). Carbonic 245 anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of 246 *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. *Biochemistry Journal* 247, 311–316.

Albasi, C., Tataridis, P., Taillandier, P., and Strehaiano, P. (2002). A new tool for the quantification of microbial interactions in liquid medium; application to wine lactic acid bacteria. *Sciences Des Aliments* 22, 189–198.

Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., and Gírio, F. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 965–972.

Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Dillmann, C., Vienne, D. de, Bely, M., and Sicard, D. (2011). Population Size Drives Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Alcoholic Fermentation and Is under Genetic Control. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2772–2784.

Albertin, W., Miot-Sertier, C., Bely, M., Marullo, P., Coulon, J., Moine, V., Colonna-Ceccaldi, B., and Masneuf-Pomarede, I. (2014a). Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. *International Journal of Food Microbiology* 178, 87–97.

Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., and Bely, M. (2014b). Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLoS ONE* 9, e94246.

Alexandre, H., Rousseaux, I., and Charpentier, C. (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters* 124, 17–22.

Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J.M., and Esteve-Zarzoso, B. (2008). Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology* 25, 849–856.

Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., and Mas, A. (2011). Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiology* 28, 1483–1491.

Anfang, N., Brajkovich, M., and Goddard, M.R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15, 1–8.

Antalick, G., Perello, M.-C., and de Revel, G. (2010). Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry* 121, 1236–1245.

Arcay-Ledezma, G.J., and Slaughter, J.C. (1984). The Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Fermentation Under Carbon Dioxide Pressure. *Journal of the Institute of Brewing* 90, 81–84.

Arneborg, N., Høy, C.-E., and Jørgensen, O.B. (1995). The effect of ethanol and specific growth rate on the lipid content and composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in a chemostat. *Yeast* 11, 953–959.

Augustin, H.W., Kopperschläger, G., Steffen, H., and Hofmann, E. (1965). [Hexokinase as limiting factor of anaerobic glucose consumption of *Saccharomyces carlsbergensis* NCYC74]. *Biochimica Biophysica Acta* 110, 437–439.

Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., and Zapparoli, G. (2012). Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *European Food Research and Technology* 235, 303–313.

Baleiras Couto, M.M., Reizinho, R.G., and Duarte, F.L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 102, 49–56.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153, 243–259.

Bardi, L., Crivelli, C., and Marzona, M. (1998). Esterase activity and release of ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 1171–1176.



Barrajón-Simancas, N., Giese, E., Arévalo-Villena, M., Úbeda, J., and Briones, A. (2011). Amino acid uptake by wild and commercial yeasts in single fermentations and co-fermentations. *Food Chemistry* 127, 441–446.

Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J.-M., Salmon, J.-M., and Barre, P. (1996). Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: Impact on alcoholic fermentation kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82, 145–150.

Beaufort, S., Luyt, N., Bauer, F., Fernandez Lopez, C.L., Brandam, C., Divol, B., and Taillandier, P. (2015). Comparaison des phénomènes d'interactions directes/indirectes lors de co-cultures entre des levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*. (Bordeaux, France),

Beaven, M.J., Charpentier, C., and Rose, A.H. (1982). Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipid Fatty-acyl Composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Microbiology* 128, 1447–1455.

Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J.M., Mas, A., and Rozès, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology* 121, 169–177.

Bely, M. et Renault P.E. (2013). Non-conventional yeasts and alcohol level reduction. Oenoviti international network.

Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., and Dubourdieu, D. (2008). Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122, 312–320.

Beopoulos, A., Nicaud, J.-M., and Gaillardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 1193–1206.

Bilinski, C.A., Russell, I., and Stewart, G.G. (1987). Applicability of Yeast Extracellular Proteinases in Brewing: Physiological and Biochemical Aspects. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 495–499.

Bisson, L. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 50, 107–119.

Blickstad, E., Enfors, S.-O., and Molin, G. (1981). Effect of Hyperbaric Carbon Dioxide Pressure on the Microbial Flora of Pork Stored at 4 or 14°C. *Journal of Applied Bacteriology* 50, 493–504.

Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M.G., Caldeira, J., and Albergaria, H. (2014). Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 843–853.

Branco, P., Viana, T., Albergaria, H., and Arneborg, N. (2015). Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *International Journal of Food Microbiology* 205, 112–118.

Brody, S., Oh, C., Hoja, U., and Schweizer, E. (1997). Mitochondrial acyl carrier protein is involved in lipoic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 408, 217–220.

Brown, W. (1915). Studies in the physiology of parasitism I. The action of *Botritis cinerea*. *Annals of Botanic* 29, 313–348.

Cabrera, M.J., Moreno, J., and Medina, M. (1988). Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 283–287.

Čadež, N., Zupan, J., and Raspor, P. (2010). The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries: Yeasts on grapes treated with fungicides. *FEMS Yeast Research* 10, 619–630.

Capriotti, A. (1957). *Torulaspora nilssoni* nov. spec.: A new yeast from Swedish soils. *Archiv Für Mikrobiologie* 28, 247–254.

Carman, G.M., and Henry, S.A. (1989). Phospholipid Biosynthesis in Yeast. *Annual Review of Biochemistry* 58, 635–667.

Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P.A., and Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research* 8, 1196–1207.

Casey, G.P., and Ingledew, W.M.M. (1986). Ethanol Tolerance in Yeasts. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 13, 219–280.

Castela, P.M., Mesias, J.L., and Maynar, J.I. (1985). Evolution of amounts of total, neutral and polar lipids in Macabeo grapes (*Vitis vinifera*) throughout their vegetative cycle. *Science des Aliments* (France).

Castelli, T. (1954). Les Agents de la Fermentation Vinaire. *Archiv Für Mikrobiologie* 20, 323–342.

Castelli, A., Littarru, G.P., and Barbaresi, G. (1969). Effect of pH and CO<sub>2</sub> concentration changes on lipids and fatty acids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archiv Für Mikrobiologie* 66, 34–39.

Ceccato-Antonini, S.R., Cremonini, L.C.M., and Regenfuss, C. (1999). “Killer” character of yeasts isolated from ethanolic fermentations. *Scientia Agricola* 56, 631–635.

Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., and Todd, B.E.N. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 3, 2–8.

Chen, S.L., and Gutmanis, F. (1976). Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. *Biotechnology and Bioengineering* 18, 1455–1462.

Cheraiti, N., Guezenec, S., and Salmon, J.-M. (2005). Redox Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in Mixed Culture under Enological Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 255–260.

Chi, Z., and Arneborg, N. (1999). Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* 86, 1047–1052.

Ciani, M., and Comitini, F. (2015). Yeast interactions in multi-starter wine fermentation. *Current Opinion in Food Science* 1, 1–6.

Ciani, M., and Maccarelli, F. (1997). Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 199–203.

Ciani, M., and Picciotti, G. (1995). The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters* 17, 1247–1250.

Ciani, M., Beco, L., and Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 239–245.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., and Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10, 123–133.

Cocolin, L., Bisson, L.F., and Mills, D.A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189, 81–87.

Coetzee, C., and du Toit, W.J. (2012). A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Research International* 45, 287–298.

Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofre, V., Ganga, A., Martinez, C., and Catania, C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1055–1061.

Comitini, F., and Ciani, M. (2006). Survival of inoculated *Saccharomyces cerevisiae* strain on wine grapes during two vintages. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 248–253.

Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., and Ciani, M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28, 873–882.

Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., and Guillamón, J.M. (1997). Analysis of Yeast Populations During Alcoholic Fermentation in a Newly Established Winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339–344.

Contreras, A., Curtin, C., and Varela, C. (2014). Yeast population dynamics reveal a potential “collaboration” between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., and Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 130–135.

Csoma, H., and Sipiczki, M. (2008). Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Research* 8, 328–336.

Czabany, T., Athenstaedt, K., and Daum, G. (2007). Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771, 299–309.

Darriet, P., Lavigne, V., Boidron, J. e, and Dubourdieu, D. (1991). Caractérisation de l’arôme variétal des vins de Sauvignon par couplage cpg-Olfactométrie. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 25, 167–174.

Darriet, P., Tominaga, T., Demole, E., and Dubourdieu, D. (1993). Mise en évidence dans le raisin de *Vitis Vinifera* var. Sauvignon d'un précurseur de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences. Série 3, Sciences de La Vie 316, 1332–1335.

Darriet, P., Tominaga, T., Lavigne, V., Boidron, J.-N., and Dubourdieu, D. (1995). Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. Flavour and Fragrance Journal 10, 385–392.

Daum, G., Lees, N.D., Bard, M., and Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14, 1471–1510.

Davenport, R.R. (1974). Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. Vitis 13, 123–130.

Delaherche, A., Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2004). Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and “ropy” *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. Journal of Applied Microbiology 97, 910–915.

DeLuna, A., Vetsigian, K., Shores, N., Hegreness, M., Colón-González, M., Chao, S., and Kishony, R. (2008). Exposing the fitness contribution of duplicated genes. Nature Genetics 40, 676–681.

DeLuna, A., Springer, M., Kirschner, M.W., and Kishony, R. (2010). Need-based up-regulation of protein levels in response to deletion of their duplicate genes. PLoS Biology 8.

Denic, V., and Weissman, J.S. (2007). A Molecular Caliper Mechanism for Determining Very Long-Chain Fatty Acid Length. Cell 130, 663–677.

Dickson, R.C., and Lester, R.L. (1999). Yeast sphingolipids. Biochimica et Biophysica Acta 1426, 347–357.

Di Maro, E., Ercolini, D., and Coppola, S. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. International Journal of Food Microbiology 117, 201–210.

Dixon, N.M., and Kell, D.B. (1989). The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of micro-organisms. Journal of Applied Bacteriology 67, 109–136.

Dowhan, W. (1997). CDP-diacylglycerol synthase of microorganism. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids 157–165.

Dubourdieu, D. (1986). Wine technology: Current trends. Experientia 42, 914–921.

Dubourdieu, D., Llauberes, R.M., and Ollivier, C. (1986). Estimation rapide des constituants macromoléculaires des moûts et des vins par chromatographie liquide haute pression. *Connaissance Vigne et Vin* 20, 119–123.

Dukes, B.C., and Butzke, C.E. (1998). Rapid Determination of Primary Amino Acids in Grape Juice Using an o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-Cysteine Spectrophotometric Assay. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 125–134.

Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Rolle, L., Gerbi, V., and Cocolin, L. (2015). Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation: Physiological and molecular characterizations. *International Journal of Food Microbiology* 199, 33–40.

Erwin, J. (1973). *Lipids and Biomembranes of Eucaryotic Microorganisms* (New York).

Fedrizzi, B., Pardon, K.H., Sefton, M.A., Elsey, G.M., and Jeffery, D.W. (2009). First Identification of 4-S-Glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a Potential Precursor of 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 991–995.

Ferenczy, S. (1966). Étude des protéines et des substances azotées. Leur évolution au cours des traitements œnologiques. Conditions de la stabilité protéique des vins. *Bulletin de l'OIV* 39, 1311–1336.

Fernández, M., Úbeda, J., and Briones, A. (2000). Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *International Journal of Food Microbiology* 59, 29–36.

Ferreira, R.B., Piçarra-Pereira, M.A., Monteiro, S., Loureiro, V.B., and Teixeira, A.R. (2001). The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology* 12, 230–239.

Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., and Cacho, J. (2002). Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4048–4054.

Fisher, S.G., and Lerman, L.S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 1579–1583.

Fleet, G. (2003). Yeasts interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11–22.

Fleet, G.H., and Heard, G.M. (1993). Yeasts: growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, (Chur, Switzerland), pp. 27–54.

Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C., Beh, A., and Heard, G. (2002). The yeast ecology of wine grapes. In *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*, (Kerala, India), pp. 1–17.

Francis, I.L., Sefton, M.A., and Williams, P.J. (1994). The Sensory Effects of Preor Post-Fermentation Thermal Processing on Chardonnay and Semillon Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 243–251.

Fredrickson, A.G. (1977). Behavior of Mixed Cultures of Microorganisms. *Annual Review of Microbiology* 31, 63–88.

Le Fur, Y., Hory, C., Bard, M.-H., and Olsson, A. (1994). Evolution of phytosterols in Chardonnay grape berry skins during last stages of ripening. *Vitis* 33, 127–131.

Gaber, R.F., Copple, D.M., Kennedy, B.K., Vidal, M., and Bard, M. (1989). The yeast gene *ERG6* is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Molecular and Cellular Biology* 9, 3447–3456.

Ganga, M.A., and Martinez, C. (2004). Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 96, 76–83.

Gao, C., and Fleet, G.H. (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 405–409.

Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., and Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology* 117, 1–28.

Geneix, C. (1984). *Recherches sur la stimulation et l'inhibition de la fermentation alcoolique du moût de raisin* (Université de Bordeaux II).

Ghareib, M., Youssef, K.A., and Khalil, A.A. (1988). Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to lipid content and composition. *Folia Microbiologica* 33, 447–452.

Gietz, R.D., and Schiestl, R.H. (1991). Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast* 7, 253–263.

Gil, J.V., Mateo, J.J., Jiménez, M., Pastor, A., and Huerta, T. (1996). Aroma Compounds in Wine as Influenced by Apiculate Yeasts. *Journal of Food Science* 61, 1247–1250.

Gill, C.O., and Tan, K.H. (1979). Effect of carbon dioxide on growth of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 237–240.

Goddard, M.R. (2008). Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology* 89, 2077–2082.

Goldstein, a L., and McCusker, J.H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* - Goldstein - 1999 - *Yeast* - Wiley Online Library. *Yeast* (Chichester, England) 15, 1541–1553.

Guerra, E., Sordi, G., Mannazzu, I.M., Clementi, F., and Fatichenti, F. (1999). Occurrence of wine yeasts on grapes subjected to different pesticide treatments. *Italian Journal of Food Science* 11, 221–230.

Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., and Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* 169, 387–392.

Gunes, G., Blum, L.K., and Hotchkiss, J.H. (2005). Inactivation of yeasts in grape juice using a continuous dense phase carbon dioxide processing system. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 2362–2368.

Haas, G.J., Prescott, H.E., Dudley, E., Dik, R., Hintlian, C., and Keane, L. (1989). Inactivation of microorganisms by carbon dioxide under pressure. *Journal of Food Safety* 9, 253–265.

Hamza, A., and Baetz, K. (2012). Iron-responsive Transcription Factor Aft1 Interacts with Kinetochores Protein Iml3 and Promotes Pericentromeric Cohesin. *Journal of Biological Chemistry* 287, 4139–4147.

Hartman, R.E., Keen, N.T., and Long, M. (1972). Carbon Dioxide Fixation by *Verticillium albo-atrum*. *Journal of General Microbiology* 73, 29–34.

Heard, G.M., and Fleet, G.H. (1985). Growth of Natural Yeast Flora during the Fermentation of Inoculated Wines. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 727–728.

Heard, G.M., and Fleet, G.H. (1987). Occurrence and Growth of Killer Yeasts during Wine



Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2171–2174.

Henry, S.A. (1982). Membrane lipids of yeast: biochemical and genetic studies. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* 11, 101–158.

Henschke, P.A. (1997). Wine yeast. In *Yeast Sugar Metabolism*, (CRC Press)

Henschke, P.A., and Jiranek, V. (1993). Yeasts: metabolism of nitrogen compounds. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, (Chur, Switzerland), pp. 27–54.

Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., Garciamoruno, E., and Ferreira, V. (2008). The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chemistry* 107, 1064–1077.

Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P.J., and Cabezudo, M.D. (1990). The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 313–318.

Holm, H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J. c., and Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 541–547.

Holmes-Hampton, G.P., Jhurry, N.D., McCormick, S.P., and Lindahl, P.A. (2013). Iron Content of *Saccharomyces cerevisiae* Cells Grown under Iron-Deficient and Iron-Overload Conditions. *Biochemistry* 52, 105–114.

Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., and Arneborg, N. (2001). The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology* 91, 541–547.

Ho-mu, L., Zhiying, Y., and Li, F.C. (1993). Inactivation of *Leuconostoc dextranicum* with carbon dioxide under pressure. *The Chemical Engineering Journal* 52, B29–B34.

Howell, K.S., Swiegers, J.H., Elsey, G.M., Siebert, T.E., Bartowsky, E.J., Fleet, G.H., Pretorius, I.S., and de Barros Lopes, M.A. (2004). Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiology Letters* 240, 125–129.

Howell, K.S., Cozzolino, D., Bartowsky, E.J., Fleet, G.H., and Henschke, P.A. (2006). Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. *FEMS Yeast Research* 6, 91–101.

Hsu, J.-C., and Heatherbell, D.A. (1987). Heat-Unstable Proteins in Wine. I. Characterization and Removal by Bentonite Fining and Heat Treatment. *American Journal of Enology and Viticulture* 38, 11–16.

Humbert-Goffard, A. (2003). Recherches sur les phénomènes enzymatiques intervenant lors de l'élevage des vins (Bordeaux 2).

Hutkins, R.W., and Nannen, N.L. (1993). pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* 76, 2354–2365.

Ibeas, J.I., and Jimenez, J. (1997). Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 7–12.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., and Pretorius, I.S. (2003a). The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *South african journal for enology and viticulture* 24, 35–42.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., and Pretorius, I.S. (2003b). The effect of non-*Saccharomyces yeasts* on fermentation and wine quality. *South African Journal for Enology and Viticulture* 24, 55–62.

Jones, R.P., and Greenfield, P.F. (1982). Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 4, 210–223.

Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M.G., Caldeira, J., Albergaria, H., and Arneborg, N. (2015). Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 362, fnv103.

King, A.D., and Nagel, C.W. (1975). Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Food Science* 40, 362–366.

Kohlwein, S.D., Eder, S., Oh, C.-S., Martin, C.E., Gable, K., Bacikova, D., and Dunn, T. (2001). Tsc13p Is Required for Fatty Acid Elongation and Localizes to a Novel Structure at the Nuclear-Vacuolar Interface in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 21, 109–125.

Kurtzman, C.P., and Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 331–371.

Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., and Ribéreau-Gayon, P. (1984). Inhibition of Alcoholic Fermentation of Grape Must by Fatty Acids Produced by Yeasts and Their Elimination by Yeast Ghosts. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 1246–1249.

Lagace, L.S., and Bisson, L.F. (1990). Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *American Journal of Enology and Viticulture* 41, 147–155.

Lambrechts, M.G., and Pretorius, I.S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma. *South African Journal for Enology and Viticulture* 21, 97–125.

Lamikanra, O., and Inyang, I.D. (1988). Temperature Influence on Muscadine Wine Protein Characteristics. *American Journal for Enology and Viticulture* 39, 113–116.

Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., and Mannazzu, I. (2008). ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1780, 892–898.

Landolfo, S., Zara, G., Zara, S., Budroni, M., Ciani, M., and Mannazzu, I. (2010). Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 141, 229–235.

Larue, F., and Lafon-Lafourcade, S. (1989). Survival factors in wine fermentation. In *Alcohol Toxicity in Yeasts and Bacteria*, (USA), pp. 193–215.

Larue, F., Lafon-Lafourcade, S., and Ribereau-Gayon, P. (1980). Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 808–811.

Leber, A., Hrastnik, C., and Daum, G. (1995). Phospholipid-synthesizing enzymes in Golgi membranes of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 377, 271–274.

Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., and Sicard, D. Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiology*.

Li, S.-S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J.-Y., Yan, B., Han, B.-Z., and Reeves, M. (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology* 138, 85–90.

Limtong, S., and Koowadjanakul, N. (2012). Yeasts from phylloplane and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 3323–3335.

Lin, H.-M., Cao, N., and Chen, L.-F. (1994). Antimicrobial Effect of Pressurized Carbon Dioxide on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science* 59, 657–659.

López-Malo, M., Chiva, R., Rozes, N., and Guillamon, J.M. (2012). Phenotypic analysis of mutant and overexpressing strains of lipid metabolism genes in *Saccharomyces cerevisiae*: Implication in growth at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 162, 26-36.

Loretan, T. (2003). Microbial flora associated with South African household kefir : research letter. *South African Journal of Science* 99, 92-94.

Luparia, V., Soubeyrand, V., Berges, T., Julien, A., and Salmon, J.-M. (2004). Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 25-32.

Magyar, I., and Tóth, T. (2011). Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28, 94–100.

Manjarrez, E.S., Albasi, C., and Riba, J.-P. (2000). A two-reservoir, hollow-fiber bioreactor for the study of mixed-population dynamics: Design aspects and validation of the approach. *Biotechnology and Bioengineering* 69, 401–408.

Martinez, J., Toledano, F., Millan, C., and Ortega, J.M. (1990). Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from “Pedro Ximenez” grapes inoculated with pure cultures of selected yeasts. *Food Microbiology* 7, 217–225.

Martini, A. (1993). Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research* 4, 165–176.

Martini, A., Ciani, M., and Scorzetti, G. (1996). Direct Enumeration and Isolation of Wine Yeasts from Grape Surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 435–440.

Masneuf-Pomarède, I., Mansour, C., Murat, M., Tominaga, T., and Dubourdieu, D. (2006). Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *International Journal of Food Microbiology* 108, 385-390.

Mateo, J.J., Maicas, S., and Thießen, C. (2015). Biotechnological characterisation of exocellular proteases produced by enological *Hanseniaspora* isolates. *Int J Food Sci Technol* 50, 218–225.

Maturano, Y.P., Rodríguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Nally, M.C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L.I., Combina, M., and Vazquez, F. (2012). Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 155, 43–50.

Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., and Carrau, F. (2012). Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 157, 245–250.

Mehlomakulu, N.N., Setati, M.E., and Divol, B. (2015). Non-*Saccharomyces* killer toxins: Possible biocontrol agents against *Brettanomyces* in wine? *South African Journal of Enology and Viticulture* 36, 94–104.

Mendoza, L.M., Manca de Nadra, M.C., and Farías, M.E. (2007). Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnology Letters* 29, 1057–1063.

Mendoza, L.M., Nadra, M.C.M., Bru, E., and Farías, M.E. (2008). Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in mixed culture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36, 229–237.

Middelbeek, E.J., Hermans, J.M.H., and Stumm, C. (1979). Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek* 45, 437–450.

Middelbeek, E.J., Stumm, C., and Vogels, G.D. (1980a). Effects of *Pichia kluyveri* killer toxin on sensitive cells. *Antonie van Leeuwenhoek* 46, 205–220.

Middelbeek, E.J., Laar, H.H.A.M. van de, Hermans, J.M.H., Stumm, C., and Vogels, G.D. (1980b). Physiological conditions affecting the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to a *Pichia kluyveri* killer toxin and energy requirement for toxin action. *Antonie van Leeuwenhoek* 46, 483–497.

Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55, 165–199.

Mills, D.A., Johannsen, E.A., and Cocolin, L. (2002). Yeast Diversity and Persistence in Botrytis-Affected Wine Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4884–4893.

Mishra, P., and Kaur, S. (1991). Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34, 697–702.

Mishra, P., and Prasad, R. (1989). Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30, 294–298.

Moine-Ledoux, V., and Dubourdieu, D. (1999). An invertase fragment responsible for improving the protein stability of dry white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 537–543.

Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., and Gonzalez, R. (2015). The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 3993–4003.

Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., and Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology* 124, 231–238.

Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J.A., Hogg, T., and Vasconcelos, I. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control* 22, 662–667.

Moreno, J.J., Millán, C., Ortega, J.M., and Medina, M. (1991). Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *Journal of Industrial Microbiology* 7, 181–189.

Mortimer, R., and Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150, 199–204.

Murat, M.L., Masneuf, I., Darriet, P., Lavigne, V., Tominaga, T., and Dubourdieu, D. (2001). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains on the Liberation of Volatile Thiols in Sauvignon blanc Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 136–139.

Muyzer, G., De Wall, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.

Nagodawithana, T.W., and Steinkraus, K.H. (1976). Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in “rapid fermentation”. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 158–162.

Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., and Lucas, P.M.

(2008). Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods: LAB producing biogenic amines in wine. *Letters in Applied Microbiology* 47, 594–599.

Neeley, E.T., Phister, T.G., and Mills, D.A. (2005). Differential Real-Time PCR Assay for Enumeration of Lactic Acid Bacteria in Wine. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8954–8957.

Nguyen, H.-V., and Panon, G. (1998). The yeast *Metschnikowia pulcherrima* has an inhibitory effect against various yeast species. *Sciences Des Aliments* 18, 515–526.

Nguyen, N.H., Suh, S.-O., and Blackwell, M. (2007). Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. *Mycologia* 99, 842–858.

Nissen, P., and Arneborg, N. (2003). Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 180, 257–263.

Nissen, P., Nielsen, D., and Arneborg, N. (2003). Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331–341.

O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, (Wallingford, UK: Reynolds DR & Taylor JW (Eds), CAB International), pp. 225–233.

Odum, E.P. (1953). *Fundamentals of ecology* (Philadelphia, USA: W. B. Saunders Company).

Ohkuni, K., Hayashi, M., and Yamashita, I. (1998). Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 623–631.

Okamoto, H. (1976). Effects of anoxia and high CO<sub>2</sub> concentration on the electrogenic activity of leaf cell membrane in the dark. *Plant and Cell Physiology* 17, 1273–1280.

Oro, L., Ciani, M., and Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 116, 1209–1217.

Oura, E., Haarasilta, S., and Londesborough, J. (1980). Carbon Dioxide Fixation by Baker's Yeast in a Variety of Growth Conditions. *Microbiology* 118, 51–58.

Pacheco, A., Santos, J., Chaves, S., Almeida, J., Leo, C., and Joo, M. (2012). The Emerging Role of the Yeast *Torulaspora delbrueckii* in Bread and Wine Production: Using Genetic Manipulation to Study Molecular Basis of Physiological Responses. In *Structure and Function of Food Engineering*, A. Amer Eissa, ed. (InTech),

Palková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., and Forstová, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 390, 532–536.

Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J.C., Amores, F., Daniel, H.-M., and De Vuyst, L. (2011). Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of the Microbiota Associated with Traditional Ecuadorian Spontaneous Cocoa Bean Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7698–7714.

Papin, J.P. (1989). Les levures sèches en oenologie. *Revue Des Oenologues* 5, 25–27.

Parks, L.W., and Adams, B.G. (1978). Metabolism of Sterols in Yeast. *Critical Reviews in Microbiology* 6, 301–341.

Parks, L.W., and Casey, W.M. (1995). Physiological Implications of Sterol Biosynthesis in Yeast. *Annual Review of Microbiology* 49, 95–116.

Perez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., and Girio, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 108, 336–345.

Perrone, B., Giacosa, S., Rolle, L., Cocolin, L., and Rantsiou, K. (2013). Investigation of the dominance behavior of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 165, 156–162.

Peynaud, E. (1956). Sur la formation d'acétate d'éthyle par les levures du vin. *Industries Agricoles et Alimentaires* 73, 253–257.

Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., and Dubourdieu, D. (2002). Sulfur Aroma Precursor Present in S-glutathione Conjugate Form: Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione in Must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4076–4079.

Pfisterer, E., Hancock, I., and Garrison, I. (1977). Effects of fermentation environment on yeast lipid synthesis [Beer]. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*.

Phister, T.G., and Mills, D.A. (2003). Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7430–7434.



Pina, C., Santos, C., Couto, J.A., and Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiology* 21, 439–447.

Pintar, J., and Starmer, W.T. (2003). The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 83, 89–97.

Plata, C., Millán, C., Mauricio, J.C., and Ortega, J.M. (2003). Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology* 20, 217–224.

Pocock, K.F., Høj, P.B., Adams, K.S., Kwiatkowski, M.J., and Waters, E.J. (2003). Combined heat and proteolytic enzyme treatment of white wines reduces haze forming protein content without detrimental effect. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9, 56–63.

Pommier, S., Strehaiano, P., and Delia, M. (2005). Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: a case of amensalism. *International Journal of Food Microbiology* 100, 131–139.

Povhe Jemec, K., Cadez, N., Zagorc, T., Bubic, V., Zupec, A., and Raspor, P. (2001). Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiology* 18, 247–259.

Pretorius, I.S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.

Radler, F., Pfeiffer, P., and Dennert, M. (1985). Killer toxins in new isolates of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *FEMS Microbiology Letters* 29, 269–272.

Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L., and Cocolin, L. (2012). *Candida zemplinina* Can Reduce Acetic Acid Produced by *Saccharomyces cerevisiae* in Sweet Wine Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1987–1994.

Rapp, A., and Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia* 42, 873–884.

Redón, M., Guillamón, J.M., Mas, A., and Rozès, N. (2009). Effect of lipid supplementation upon *Saccharomyces cerevisiae* lipid composition and fermentation performance at low temperature. *European Food Research and Technology* 228, 833–840.

Reed, G., and Nagodawithana, T.W. (1988). Technology of Yeast Usage in Winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 83–90.

Reid, V.J., Theron, L.W., du Toit, M., and Divol, B. (2012). Identification and Partial Characterization of Extracellular Aspartic Protease Genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWB T Y1123 and *Candida apicola* IWB T Y1384. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 6838–6849.

Renault, P.-E. (2010). Caractérisation phénotypique de l'espèce *Torulaspora delbrueckii* en conditions œnologiques. Application à la co-inoculation avec l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Bordeaux 2).

Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., and Bely, M. (2009). Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 134, 201–210.

Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J.-C., and Bely, M. (2015). Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *International Journal of Food Microbiology* 207, 40–48.

Renault, P., Coulon, J., Moine, V., Thibon, C., and Bely, M. (soumis novembre 2015). Enhanced 3-sulfanylhexas-1-ol production in sequential mixed fermentation with *T. delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* reveals a synergistic interaction between the 2 species.

Renault, P.E., Albertin, W., and Bely, M. (2013). An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 4105-4119.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., and Dubourdieu, D. (2012). *Traité d'œnologie - Tome 2 - 6e éd. - Chimie du vin. Stabilisation et traitements* (Paris: Dunod).

Richard, P., Bakker, B.M., Teusink, B., Dam, K., and Westerhoff, H.V. (1996). Acetaldehyde Mediates the Synchronization of Sustained Glycolytic Oscillations in Populations of Yeast Cells. *European Journal of Biochemistry* 235, 238–241.

Rockwell, G.E., and Highberger, J.H. (1927). The necessity of carbon dioxide for the growth of bacteria, yeasts and molds. *Journal of Infectious Diseases* 40, 438–446.

Rodriguez, R.J., Taylor, F.R., and Parks, L.W. (1982). A requirement for ergosterol to permit growth of yeast sterol auxotrophs on cholestanol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 106, 435–441.

Rodriguez, R.J., Low, C., Bottema, C.D.K., and Parks, L.W. (1985). Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 837, 336–343.

Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., and Cavelier, F. (2011). Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. *Chemical Reviews* 111, 7355–7376.

Romano, P. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 169–180.

Rosenfeld, E., and Beauvoit, B. (2003). Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20, 1115–1144.

Rosi, I., Vinella, M., and Domizio, P. (1994). Characterization of  $\beta$ -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 519–527.

Rozes, N. (1992). Contribution à l'étude du métabolisme lipidique de *Saccharomyces cerevisiae*. Application à la différenciation des levures du vin. Université de Bordeaux II.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., and Guillamón, J.M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research* 157, 267–274.

Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., and Alexandre, H. (2012). Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology* 32, 243–253.

Šajbidor, J., and Grego, J. (1992). Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiology Letters* 93, 13–16.

Salmon, J., Vincent, O., Mauricio, J., Bely, M., and Barre, P. (1993). Sugar Transport Inhibition and Apparent Loss of Activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a Major Limiting Factor of Enological Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 44, 56–64.

Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A., and Guillamón, J.M. (2011). Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology* 28, 1155–1161.

Schneider, R., Brors, B., Bürger, F., Camrath, S., and Weiss, H. (1997). Two genes of the putative mitochondrial fatty acid synthase in the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 32, 384–388.

Shen, H., Heacock, P.N., Clancey, C.J., and Dowhan, W. (1996). The CDS1 gene encoding CDP-diacylglycerol synthase in *Saccharomyces cerevisiae* is essential for cell growth. *Journal of Biological Chemistry* 789–795.

Shimizu, K. (1993). Killer yeasts. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, (Chur, Switzerland), pp. 243–264.

Shinohara, T., Kubodera, S., and Yanagida, F. (2000). Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90, 90–97.

Sipiczki, M. (2003). *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 53, 2079–2083.

Sipiczki, M. (2004). Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *Journal of Basic Microbiology* 44, 471–479.

Sipiczki, M., Ciani, M., and Csoma, H. (2005). Taxonomic reclassification of *Candida stellata* DBVPG 3827. *Folia Microbiologica* 50, 494–498.

Soden, A., Francis, I. I., Oakey, H., and Henschke, P. a. (2000). Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6, 21–30.

Sorger, D., and Daum, G. (2003). Triacylglycerol biosynthesis in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 289–299.

Spilimbergo, S., Elvassore, N., and Bertucco, A. (2002). Microbial inactivation by high-pressure. *The Journal of Supercritical Fluids* 22, 55–63.

Spilimbergo, S., Bertucco, A., Basso, G., and Bertoloni, G. (2005). Determination of extracellular and intracellular pH of *Bacillus subtilis* suspension under CO<sub>2</sub> treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 92, 447–451.

Starmer, W.T., Ganter, P.F., and Aberdeen, V. (1992). Geographic distribution and genetics of killer phenotypes for the yeast *Pichia kluyveri* across the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 990–997.

Straskrabová, V., Páca, J., and Králícková, E. (1980). Effect of aeration and carbon dioxide on cell morphology of *Candida utilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 855–861.

Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., and van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 91, 182–190.

Strehaiano, P., Nehme, N., Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., Mathieu, F., and Taillandier, P. (2008). Microbial interactions in winemaking. In *Current Topics on Bioprocesses in Food Industry*, (Asiatech Publishers Inc.), pp. 296–311.

Strydom, M., Kirschbaum, A.F., and Tromp, A. (1982). Ergosterol concentrations of several different *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *South African Journal for Enology and Viticulture* 3, 23-28.

Subileau, M., Schneider, R., Salmon, J.-M., and Degryse, E. (2008). New Insights on 3-Mercaptohexanol (3MH) Biogenesis in Sauvignon Blanc Wines: Cys-3MH and (E)-Hexen-2-al Are Not the Major Precursors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56, 9230–9235.

Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., and Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30, 1959–1967.

Teixeira de Mattos, M.J., Plomp, P.J.A.M., Neijssel, O.M., and Tempest, D.W. (1984). Influence of metabolic end-products on the growth efficiency of *Klebsiella aerogenes* in anaerobic chemostat culture. *Antonie van Leeuwenhoek* 50, 461–472.

Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., and Remize, F. (2009). Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology* 129, 237–243.

Thomas, D.S., Hossack, J.A., and Rose, A.H. (1978). Plasma-Membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 117, 239–245.

Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Luca, C., Perpetuini, G., and Suzzi, G. (2012). Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiology* 29, 18–26.

Tokuoka, K., Ishitani, T., Goto, S., and Komagata, K. (1985). Identification of Yeasts Isolated from High-Sugar Foods. *The Journal of General and Applied Microbiology* 31, 411–427.

Tominaga, T., and Dubourdieu, D. (2006). A Novel Method for Quantification of 2-Methyl-3-furanthiol and 2-Furanmethanethiol in Wines Made from *Vitis vinifera* Grape Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 29–33.

Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., and Dubourdieu, D. (1998). A New Type of Flavor Precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 5215–5219.

Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Gachons, C.P.D., and Dubourdieu, D. (2000). Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 178–181.

Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., and Rozès, N. (2003). Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces species* on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology* 85, 127–136.

Ueda, K., Tagami, Y., Kamihara, Y., Shiratori, H., Takano, H., and Beppu, T. (2008). Isolation of Bacteria Whose Growth Is Dependent on High Levels of CO<sub>2</sub> and Implications of Their Potential Diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4535–4538.

Urso, R., Rantsiou, K., Dolci, P., Rolle, L., Comi, G., and Cocolin, L. (2008). Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Research* 8, 1053–1062.

Vaughan-Martini, A., and Martini, A. (1995). Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 514–522.

Viana, F., Gil, J., Genoves, S., Valles, S., and Manzanares, P. (2008). Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology* 25, 778–785.

Walker-Caprioglio, H.M., Casey, W.M., and Parks, L.W. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2853–2857.

Wang, C., Mas, A., and Esteve-Zarzoso, B. (2015). Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 206, 67–74.

Waters, E.J., Wallace, W., and Williams, P.J. (1992). Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1514–1519.

Waters, E.J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K.F., Colby, C., O’neill, B.K., Høj, P.B., and Jones, P. (2005). Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 215–225.

Welthagen, J. (1998). Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 41, 185–194.

White, T.J., Burns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications.*, (San Diego: Academic Press), pp. 315–322.

You, K.M., Rosenfield, C.-L., and Knipple, D.C. (2003). Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1499–1503.

Young, T.W. (1987). Yeasts and the Environment. In *The Yeasts.*, (San Diego, London, New York: Academic Press), pp. 131–164.

Zara, G., Mannazzu, I., Del Caro, A., Budroni, M., Pinna, M.B., Murru, M., Farris, G.A., and Zara, S. (2014). Wine quality improvement through the combined utilisation of yeast hulls and *Candida zemplinina* / *Saccharomyces cerevisiae* mixed starter cultures: Effect of yeast hulls on mixed wine fermentations. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20, 199–207.

Zimmer, A. (2013). Etude du déterminisme génétique de la phase de latence chez *Saccharomyces cerevisiae* en conditions oenologiques. Impact des mécanismes de résistance au SO<sub>2</sub>. (Université de Bordeaux 2, France).

Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F., and Daum, G. (1991). Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 173, 2026–2034.

Zorg, J., Kilian, S., and Radler, F. (1988). Killer toxin producing strains of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *Archives of Microbiology* 149, 261–267.

Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., and Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125, 197–203.

Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., and Masneuf-Pomarede, I. (2010). Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology* 27, 559–567.

Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., and Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: Impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology* 151, 210–215.



## Annexes

---

**Annexe 1 : Paramètres de croissance, de fermentation et dosages effectués en fin de fermentation pour l'ensemble des essais réalisés en fermenteur double compartiments**

		Cultures mixtes		Cultures pures			
		Mélange	Séparation	<i>S. cerevisiae</i> 1 compartiment	<i>S. cerevisiae</i> 2 compartiments	<i>T. delbrueckii</i> 1 compartiment	<i>T. delbrueckii</i> 2 compartiments
Cinétiques de fermentations alcooliques	Phase de latence FA (h)	19,67 ± 2,40	18,78 ± 1,83	19,11 ± 2,59	15,33 ± 0,00	25,84 ± 3,06	26,56 ± 3,50
	Durée de FA (h)	230,33 <sup>a</sup> ± 20,21	198,66 <sup>b</sup> ± 13,11	208,00 <sup>ab</sup> ± 12,89	191,01 <sup>b</sup> ± 9,43		
	Durée avant Vmax (h)	29,66 ± 2,18	32,89 ± 2,52	21,22 ± 6,75	24,67 ± 0,47	35,83 ± 8,63	39,67 ± 14,89
	Vmax (h)	0,90 <sup>c</sup> ± 0,03	1,03 <sup>b</sup> ± 0,05	0,96 <sup>bc</sup> ± 0,08	1,10 <sup>a</sup> ± 0,11	0,46 <sup>d</sup> ± 0,07	0,50 <sup>d</sup> ± 0,07
Cinétiques de croissance <i>S. cerevisiae</i>	Phase de latence croissance (h)	33,4 ± 1,8	33,0 ± 1,7	32,9 ± 2,0	34,4 ± 1,6		
	Capacité biotique (UFC/mL)	1,1E+08 <sup>a</sup> ± 1,0E+07	5,8E+07 <sup>b</sup> ± 5,5E+06	1,5E+08 <sup>a</sup> ± 5,8E+07	1,3E+08 <sup>a</sup> ± 4,9E+06		
	Taux de mortalité (nombre de cellules mortes/h)	0,20 ± 0,20	0,47 ± 0,14	0,69 ± 0,14	0,41 ± 0,08		
Cinétiques de croissance <i>T. delbrueckii</i>	Phase de latence croissance (h)	16,2 ± 2,3	14,5 ± 1,7			15,8 ± 1,5	15,7 ± 2,1
	Capacité biotique (UFC/mL)	9,9E+07 ± 4,9E+06	1,1E+08 ± 2,8E+07			1,3E+08 ± 1,3E+07	1,4E+08 ± 4,4E+7
Analyses physico-chimiques classiques	Taux de mortalité (nombre de cellules mortes/h)	0,76 <sup>a</sup> ± 0,12	0,34 <sup>b</sup> ± 0,07			0,32 <sup>b</sup> ± 0,04	0,35 <sup>b</sup> ± 0,04
	TAV (% vol.)	11,46 <sup>a</sup> ± 0,27	11,37 <sup>a</sup> ± 0,68	11,58 <sup>a</sup> ± 0,69	11,36 <sup>a</sup> ± 0,30	10,24 <sup>b</sup> ± 0,69	10,22 <sup>b</sup> ± 0,63
	Sucres résiduels (g/L)	0,03 <sup>b</sup> ± 0,01	0,02 <sup>b</sup> ± 0,02	0,08 <sup>b</sup> ± 0,05	0,03 <sup>b</sup> ± 0,03	22,80 <sup>a</sup> ± 1,19	20,60 <sup>a</sup> ± 1,73
	Acidité volatile (g/L d'acide acétique)	0,07 <sup>b</sup> ± 0,03	0,08 <sup>b</sup> ± 0,06	0,13 <sup>b</sup> ± 0,02	0,10 <sup>b</sup> ± 0,01	0,45 <sup>a</sup> ± 0,02	0,42 <sup>a</sup> ± 0,02
	SO <sub>2</sub> total (mg/L)	8,00 <sup>bc</sup> ± 0,76	11,20 <sup>b</sup> ± 2,02	20,40 <sup>a</sup> ± 1,53	21,67 <sup>a</sup> ± 0,29	6,73 <sup>c</sup> ± 1,04	7,33 <sup>c</sup> ± 1,06
	Glycérol (g/L)	5,73 ± 0,23	5,95 ± 0,04	5,45 ± 0,51	5,78 ± 0,22	6,04 ± 0,26	6,07 ± 0,32
	4MSP	10,02 <sup>c</sup> ± 1,63	10,44 <sup>c</sup> ± 0,88	40,98 <sup>a</sup> ± 1,29	37,09 <sup>b</sup> ± 0,44	ND	
Thiols volatils (ng/mL)	3SH	780,20 <sup>b</sup> ± 86,24	1052,76 <sup>a</sup> ± 101,32	653,53 <sup>c</sup> ± 38,23	709,39 <sup>bc</sup> ± 70,67	788,41 <sup>b</sup> ± 41,36	945,41 <sup>a</sup> ± 76,83

Paramètres et composés présentant une différence significative en fonction des différentes modalités (test de Kruskal-Wallis, p<0,05)

**Annexe 1 (suite): Paramètres de croissance, de fermentation et dosages effectués en fin de fermentation pour l'ensemble des essais réalisés en fermenteur double compartiments**

	Cultures mixtes		Cultures pures				
	Mélange	Séparation	<i>S. cerevisiae</i> 1 compartiment	<i>S. cerevisiae</i> 2 compartiments	<i>T. delbrueckii</i> 1 compartiment	<i>T. delbrueckii</i> 2 compartiments	
Esters (µg/L)	Propanoate d'éthyle	173,41 <sup>a</sup> ± 53,30	199,19 <sup>a</sup> ± 3,69	60,52 <sup>b</sup> ± 5,75	56,52 <sup>b</sup> ± 1,34	134,55 <sup>a</sup> ± 41,36	108,77 <sup>a</sup> ± 1,39
	Isobutanoate d'éthyle	48,35 <sup>bc</sup> ± 3,98	51,35 <sup>bc</sup> ± 11,42	8,94 <sup>c</sup> ± 2,58	11,93 <sup>c</sup> ± 1,83	134,55 <sup>a</sup> ± 1,21	82,19 <sup>ab</sup> ± 14,02
	Acetate de propyle	38,24 ± 7,55	31,07 ± 7,20	42,33 ± 8,12	28,27 ± 2,71	91,81 ± 11,44	23,79 ± 3,02
	Acetate d'isobutyle	48,87 <sup>a</sup> ± 5,00	45,60 <sup>a</sup> ± 1,68	40,45 <sup>a</sup> ± 6,83	31,97 <sup>ab</sup> ± 7,06	26,86 <sup>b</sup> ± 0,56	18,95 <sup>b</sup> ± 2,94
	Butyrate d'éthyle	152,57 ± 40,07	159,98 ± 9,79	172,53 ± 5,81	163,13 ± 23,78	122,93 ± 0,05	121,49 ± 7,24
	2-Méthylbutyrate d'éthyle	2,00 ± 0,32	1,95 ± 0,63	1,24 ± 0,46	1,72 ± 0,23	1,12 ± 7,15	1,42 ± 0,17
	Isovalerate d'éthyle	2,63 ± 0,67	2,50 ± 0,78	2,70 ± 0,91	3,40 ± 0,38	1,46 ± 0,02	1,16 ± 0,14
	Acetate d'isoamyle	1246,61 <sup>ab</sup> ± 79,51	1344,82 <sup>a</sup> ± 11,23	1273,52 <sup>ab</sup> ± 134,7	1156,10 <sup>a</sup> ± 18,81	1,57 <sup>c</sup> ± 0,07	5,08 <sup>bc</sup> ± 2,33
	Hexanoate d'éthyle	215,87 <sup>a</sup> ± 60,48	243,31 <sup>a</sup> ± 26,07	237,07 <sup>a</sup> ± 101,5	330,72 <sup>a</sup> ± 40,23	50,67 <sup>b</sup> ± 11,04	55,02 <sup>b</sup> ± 6,93
	Butyrate d'isoamyle	0,22 ± 0,08	0,17 ± 0,03	0,17 ± 0,05	0,19 ± 0,01	98,71 ± 0,30	0,16 ± 0,03
	Acétate d'hexyle	52,65 <sup>bc</sup> ± 5,05	62,65 <sup>ab</sup> ± 5,90	58,69 <sup>ab</sup> ± 4,94	66,85 <sup>a</sup> ± 2,70	0,22 <sup>d</sup> ± 0,01	2,31 <sup>d</sup> ± 0,74
	Octanoate d'éthyle	119,86 <sup>b</sup> ± 0,61	165,87 <sup>b</sup> ± 26,93	232,09 <sup>a</sup> ± 23,83	230,35 <sup>a</sup> ± 0,35	4,01 <sup>c</sup> ± 0,37	6,65 <sup>c</sup> ± 5,29
	Décanoate d'éthyle	16,95 <sup>b</sup> ± 1,35	17,42 <sup>bc</sup> ± 5,06	42,38 <sup>a</sup> ± 6,36	48,94 <sup>a</sup> ± 0,34	24,17 <sup>d</sup> ± 3,30	7,41 <sup>d</sup> ± 1,43
	Octanoate d'isoamyle	1,61 ± 1,28	1,03 ± 0,67	1,31 ± 0,72	1,68 ± 0,40	7,75 ± 1,48	0,13 ± 0,65
	Méthyl trans-geranate	3,01 ± 1,61	3,43 ± 2,33	3,07 ± 1,22	4,03 ± 0,75	0,21 ± 0,01	1,35 ± 1,58
	Dodécanoate d'éthyle	3,27 ± 3,90	2,27 ± 1,79	5,54 ± 5,04	3,19 ± 1,13	2,36 ± 1,02	2,58 ± 7,58
	Acétate de phényl-éthyle	303,50 <sup>b</sup> ± 54,09	297,50 <sup>b</sup> ± 72,89	413,41 <sup>a</sup> ± 46,95	254,88 <sup>b</sup> ± 65,59	3,10 <sup>c</sup> ± 1,78	1,24 <sup>c</sup> ± 0,68
	Dihydrocinnamate d'éthyle	2,55 <sup>c</sup> ± 0,89	3,95 <sup>b</sup> ± 0,87	0,60 <sup>e</sup> ± 0,20	1,46 <sup>d</sup> ± 0,25	13,60 <sup>a</sup> ± 9,62	9,99 <sup>a</sup> ± 0,65

Paramètres et composés présentant une différence significative en fonction des différentes modalités (test de Kruskal-Wallis, p<0,05)

**Annexe 2: Paramètres de croissance et de fermentation des différentes espèces de non-*Saccharomyces* et *S. cerevisiae* en culture pure en présence de CO<sub>2</sub>, d'azote et des produits commerciaux A, C et F**

	Condition	Vitesse maximale de croissance (cell viables/mL/h)	Capacité biotique (cell viables/mL)	Taux de mortalité (nombre de cellules mortes/h)	Phase de latence fermentation (h)	Vitesse maximale de fermentation (g CO <sub>2</sub> dégagé/L/h)	CO <sub>2</sub> maximum dégagé (g/L)
<i>S. cerevisiae</i> PLC	Témoin	0,13 <sup>a</sup> ± 0,03	1,6E+08 <sup>b</sup> ± 8,2E+06	8,6E+05 <sup>a</sup> ± 4,0E+05	17,7 <sup>c</sup> ± 0,5	1,07 <sup>a</sup> ± 0,03	83,0 <sup>a</sup> ± 0,0
	CO <sub>2</sub>	0,08 <sup>b</sup> ± 0,01	9,6E+07 <sup>e</sup> ± 2,4E+06	2,5E+05 <sup>e</sup> ± 3,2E+04	21,9 <sup>b</sup> ± 0,3	0,86 <sup>b</sup> ± 0,02	83,3 <sup>a</sup> ± 0,6
	N <sub>2</sub>	0,12 <sup>a</sup> ± 0,04	1,4E+08 <sup>bc</sup> ± 9,4E+06	2,6E+05 <sup>e</sup> ± 1,5E+04	18,6 <sup>c</sup> ± 1,3	1,07 <sup>a</sup> ± 0,04	83,0 <sup>a</sup> ± 0,0
	Produit A	0,08 <sup>b</sup> ± 0,02	1,9E+08 <sup>a</sup> ± 8,2E+06	6,3E+05 <sup>b</sup> ± 1,2E+04	17,5 <sup>c</sup> ± 0,9	1,00 <sup>a</sup> ± 0,00	83,0 <sup>a</sup> ± 0,7
	Produit C	0,14 <sup>a</sup> ± 0,02	1,6E+08 <sup>bc</sup> ± 4,7E+06	5,3E+05 <sup>c</sup> ± 1,1E+04	20,9 <sup>b</sup> ± 0,8	1,04 <sup>a</sup> ± 0,01	82,1 <sup>a</sup> ± 1,9
	Produit F	0,15 <sup>a</sup> ± 0,04	1,0E+08 <sup>d</sup> ± 1,5E+06	3,6E+0d <sup>c</sup> ± 1,1E+04	31,9 <sup>a</sup> ± 0,1	1,05 <sup>a</sup> ± 0,01	85,6 <sup>a</sup> ± 0,5
<i>S. cerevisiae</i> PLL	Témoin	0,09 <sup>b</sup> ± 0,01	1,8E+08 <sup>a</sup> ± 9,4E+06	8,8E+05 <sup>a</sup> ± 3,1E+05	68,5 <sup>c</sup> ± 0,4	0,79 <sup>c</sup> ± 0,01	85,3 <sup>a</sup> ± 0,0
	CO <sub>2</sub>	0,05 <sup>e</sup> ± 0,03	1,5E+08 <sup>bc</sup> ± 4,7E+06	2,1E+05 <sup>c</sup> ± 6,5E+04	84,0 <sup>a</sup> ± 3,4	0,93 <sup>a</sup> ± 0,02	85,7 <sup>a</sup> ± 0,7
	N <sub>2</sub>	0,09 <sup>b</sup> ± 0,02	1,4E+08 <sup>bc</sup> ± 1,0E+07	2,9E+05 <sup>c</sup> ± 4,9E+04	68,2 <sup>c</sup> ± 0,2	0,79 <sup>c</sup> ± 0,01	85,3 <sup>a</sup> ± 0,0
	Produit A	0,05 <sup>d</sup> ± 0,02	1,4E+08 <sup>bc</sup> ± 2,3E+06	6,1E+05 <sup>b</sup> ± 6,5E+04	66,2 <sup>c</sup> ± 0,9	0,95 <sup>a</sup> ± 0,02	85,2 <sup>a</sup> ± 0,9
	Produit C	0,13 <sup>a</sup> ± 0,01	1,5E+08 <sup>bc</sup> ± 8,2E+06	2,3E+05 <sup>c</sup> ± 3,0E+04	82,4 <sup>a</sup> ± 1,4	0,92 <sup>a</sup> ± 0,02	82,4 <sup>a</sup> ± 0,4
	Produit F	0,05 <sup>d</sup> ± 0,09	1,3E+08 <sup>c</sup> ± 8,2E+06	1,3E+05 <sup>c</sup> ± 6,6E+04	77,8 <sup>ab</sup> ± 0,6	0,86 <sup>b</sup> ± 0,02	84,9 <sup>a</sup> ± 3,3
<i>T. delbrueckii</i>	Témoin	0,14 <sup>b</sup> ± 0,03	1,6E+08 <sup>b</sup> ± 8,2E+05	3,0E+05 <sup>b</sup> ± 1,4E+04	25,6 <sup>b</sup> ± 0,2	0,66 <sup>ab</sup> ± 0,04	67,76 <sup>b</sup> ± 0,2
	CO <sub>2</sub>	0,19 <sup>a</sup> ± 0,04	1,8E+08 <sup>ab</sup> ± 2,2E+06	9,1E+05 <sup>a</sup> ± 7,6E+04	29,5 <sup>a</sup> ± 2,2	0,65 <sup>b</sup> ± 0,00	60,08 <sup>c</sup> ± 0,7
	N <sub>2</sub>	0,05 <sup>d</sup> ± 0,02	9,5E+07 <sup>d</sup> ± 8,2E+06	3,1E+05 <sup>b</sup> ± 7,2E+04	28,8 <sup>a</sup> ± 0,9	0,59 <sup>c</sup> ± 0,02	60,56 <sup>c</sup> ± 1,4
	Produit A	0,08 <sup>c</sup> ± 0,03	1,0E+08 <sup>c</sup> ± 4,4E+06	8,5E+05 <sup>a</sup> ± 1,4E+05	25,0 <sup>b</sup> ± 0,4	0,64 <sup>b</sup> ± 0,03	67,38 <sup>b</sup> ± 0,2
	Produit C	0,14 <sup>b</sup> ± 0,03	1,0E+08 <sup>c</sup> ± 4,7E+06	1,9E+05 <sup>c</sup> ± 2,2E+04	25,3 <sup>b</sup> ± 0,4	0,68 <sup>ab</sup> ± 0,03	67,72 <sup>b</sup> ± 0,1
	Produit F	0,07 <sup>c</sup> ± 0,03	2,0E+08 <sup>a</sup> ± 0,0E+00	1,3E+05 <sup>c</sup> ± 3,4E+04	25,3 <sup>a</sup> ± 0,1	0,68 <sup>ab</sup> ± 0,02	72,68 <sup>a</sup> ± 0,3
<i>Metschnikowia</i> spp.	Témoin	0,11 <sup>b</sup> ± 0,01	1,0E+08 <sup>c</sup> ± 4,7E+06	4,5E+05 <sup>a</sup> ± 9,1E+03	22,2 <sup>c</sup> ± 2,1	0,57 <sup>a</sup> ± 0,05	52,86 <sup>b</sup> ± 1,4
	CO <sub>2</sub>	0,13 <sup>a</sup> ± 0,03	1,5E+08 <sup>a</sup> ± 7,7E+06	4,7E+05 <sup>a</sup> ± 1,8E+04	45,9 <sup>a</sup> ± 1,0	0,37 <sup>b</sup> ± 0,08	36,33 <sup>d</sup> ± 2,1
	N <sub>2</sub>	0,06 <sup>c</sup> ± 0,03	4,1E+07 <sup>f</sup> ± 3,7E+06	1,5E+05 <sup>b</sup> ± 1,5E+04	48,7 <sup>a</sup> ± 1,6	0,20 <sup>d</sup> ± 0,01	36,68 <sup>d</sup> ± 1,3
	Produit A	0,09 <sup>c</sup> ± 0,05	5,1E+07 <sup>e</sup> ± 4,5E+06	1,9E+05 <sup>bc</sup> ± 9,9E+03	31,0 <sup>b</sup> ± 2,3	0,27 <sup>c</sup> ± 0,02	49,41 <sup>c</sup> ± 3,7
	Produit C	0,04 <sup>c</sup> ± 0,04	7,9E+07 <sup>d</sup> ± 5,2E+06	7,8E+04 <sup>d</sup> ± 3,4E+04	33,9 <sup>b</sup> ± 0,4	0,29 <sup>c</sup> ± 0,00	47,40 <sup>c</sup> ± 0,0
	Produit F	0,13 <sup>a</sup> ± 0,02	4,8E+07 <sup>ef</sup> ± 3,1E+06	6,3E+04 <sup>d</sup> ± 1,4E+04	23,3 <sup>c</sup> ± 0,8	0,34 <sup>b</sup> ± 0,01	61,93 <sup>a</sup> ± 0,6
<i>C. zemplinina</i>	Témoin	0,11 <sup>b</sup> ± 0,03	1,9E+08 <sup>d</sup> ± 4,7E+06	2,8E+05 <sup>e</sup> ± 8,6E+04	22,3 <sup>e</sup> ± 3,1	0,74 <sup>ab</sup> ± 0,13	60,06 <sup>b</sup> ± 0,5
	CO <sub>2</sub>	0,12 <sup>b</sup> ± 0,06	8,7E+07 <sup>f</sup> ± 1,2E+06	3,7E+05 <sup>d</sup> ± 2,3E+04	39,5 <sup>b</sup> ± 4,0	0,36 <sup>cd</sup> ± 0,01	52,26 <sup>c</sup> ± 0,3
	N <sub>2</sub>	0,21 <sup>a</sup> ± 0,05	1,3E+08 <sup>e</sup> ± 9,4E+06	3,4E+05 <sup>d</sup> ± 1,2E+04	49,8 <sup>a</sup> ± 4,8	0,30 <sup>d</sup> ± 0,02	50,34 <sup>c</sup> ± 1,3
	Produit A	0,12 <sup>b</sup> ± 0,02	3,3E+08 <sup>b</sup> ± 1,2E+07	1,4E+06 <sup>a</sup> ± 4,5E+04	30,5 <sup>bc</sup> ± 1,5	0,92 <sup>a</sup> ± 0,03	80,32 <sup>a</sup> ± 0,5
	Produit C	0,09 <sup>c</sup> ± 0,05	3,7E+08 <sup>a</sup> ± 1,1E+07	9,5E+05 <sup>b</sup> ± 1,5E+05	27,4 <sup>d</sup> ± 2,3	0,70 <sup>ab</sup> ± 0,04	77,27 <sup>a</sup> ± 0,8
	Produit F	0,09 <sup>c</sup> ± 0,01	2,2E+08 <sup>c</sup> ± 1,4E+07	5,0E+05 <sup>c</sup> ± 5,7E+04	30,0 <sup>c</sup> ± 0,7	0,57 <sup>bc</sup> ± 0,02	60,83 <sup>b</sup> ± 0,2
<i>P. kluyveri</i>	Témoin	0,18 <sup>a</sup> ± 0,01	4,6E+07 <sup>c</sup> ± 1,9E+06	7,5E+04 <sup>c</sup> ± 1,7E+04	32,1 <sup>d</sup> ± 0,5	0,23 <sup>a</sup> ± 0,02	24,99 <sup>b</sup> ± 1,0
	CO <sub>2</sub>	0,09 <sup>d</sup> ± 0,05	2,5E+07 <sup>d</sup> ± 1,2E+06	9,1E+04 <sup>b</sup> ± 3,4E+03	75,9 <sup>a</sup> ± 4,9	0,09 <sup>b</sup> ± 0,00	7,99 <sup>c</sup> ± 1,1
	N <sub>2</sub>	0,15 <sup>ab</sup> ± 0,01	4,2E+07 <sup>c</sup> ± 1,2E+06	7,9E+04 <sup>c</sup> ± 5,9E+02	52,6 <sup>b</sup> ± 1,0	0,09 <sup>b</sup> ± 0,01	10,15 <sup>c</sup> ± 0,3
	Produit A	0,10 <sup>d</sup> ± 0,04	8,6E+07 <sup>a</sup> ± 5,4E+06	2,0E+05 <sup>a</sup> ± 6,3E+04	45,8 <sup>c</sup> ± 5,2	0,23 <sup>a</sup> ± 0,01	36,20 <sup>a</sup> ± 1,7
	Produit C	0,12 <sup>b</sup> ± 0,03	5,6E+07 <sup>b</sup> ± 8,2E+05	1,4E+05 <sup>a</sup> ± 5,0E+04	31,9 <sup>d</sup> ± 2,6	0,23 <sup>a</sup> ± 0,02	36,90 <sup>a</sup> ± 1,8
	Produit F	0,12 <sup>b</sup> ± 0,09	5,9E+07 <sup>b</sup> ± 2,6E+06	4,6E+04 <sup>d</sup> ± 7,8E+03	45,1 <sup>c</sup> ± 2,0	0,11 <sup>b</sup> ± 0,04	37,73 <sup>a</sup> ± 0,3
<i>H. uvarum</i>	Témoin	0,21 <sup>b</sup> ± 0,03	4,2E+07 <sup>a</sup> ± 1,2E+06	3,5E+04 <sup>d</sup> ± 6,4E+03	32,1 <sup>c</sup> ± 0,5	0,12 <sup>a</sup> ± 0,04	18,24 <sup>b</sup> ± 2,3
	CO <sub>2</sub>	0,06 <sup>d</sup> ± 0,04	7,9E+06 <sup>d</sup> ± 3,7E+05	3,8E+04 <sup>d</sup> ± 2,1E+03	60,0 <sup>a</sup> ± 3,2	0,04 <sup>b</sup> ± 0,02	6,20 <sup>d</sup> ± 1,7
	N <sub>2</sub>	0,03 <sup>e</sup> ± 0,02	1,7E+07 <sup>c</sup> ± 4,2E+06	1,2E+05 <sup>a</sup> ± 1,4E+04	42,2 <sup>b</sup> ± 2,8	0,05 <sup>b</sup> ± 0,02	7,12 <sup>d</sup> ± 2,6
	Produit A	0,07 <sup>d</sup> ± 0,03	1,8E+07 <sup>c</sup> ± 3,6E+06	7,9E+04 <sup>b</sup> ± 1,5E+03	14,4 <sup>e</sup> ± 1,9	0,03 <sup>b</sup> ± 0,01	9,85 <sup>c</sup> ± 3,1
	Produit C	0,26 <sup>a</sup> ± 0,02	4,1E+07 <sup>a</sup> ± 2,8E+06	4,5E+04 <sup>c</sup> ± 2,3E+03	25,4 <sup>d</sup> ± 3,4	0,12 <sup>a</sup> ± 0,05	26,81 <sup>a</sup> ± 2,3
	Produit F	0,15 <sup>c</sup> ± 0,07	2,8E+07 <sup>b</sup> ± 1,3E+06	5,4E+04 <sup>c</sup> ± 1,1E+03	33,1 <sup>c</sup> ± 4,1	0,05 <sup>b</sup> ± 0,03	6,43 <sup>d</sup> ± 1,2

# Liste des publications et communications

---

## **Publications scientifiques dans revues internationales à comité de lecture**

Laura Chasseriaud, Cécile Miot-Sertier, Joana Coulon, Nerea Iturmendi, Virginie Moine, Warren Albertin, Marina Bely. A new method for monitoring extracellular proteolytic activity of wine yeasts during alcoholic fermentation of grape must. *Journal of Microbiological Methods* (Acceptée le 30/10/2015, DOI : 10.1016/j.mimet.2015.10.025).

Laura Chasseriaud, Sibylle Krieger-Weber, Magali Délérès-Bou, Nathalie Sieczkowski, Michael Jourdes, Pierre Louis Teissedre, Olivier Claisse, Aline Lonvaud-Funel (2015). Hypotheses on the effects of enological tannins and total red wine phenolic compounds on *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*, 52, 131–137.

Warren Albertin, Laura Chasseriaud, Guillaume Comte, Aurélie Panfili, Adline Delcamp, Franck Salin, Philippe Marullo, Marina Bely (2014). Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLoS ONE* 9 :e94246.

## **Communications affichées en congrès internationaux**

Laura Chasseriaud, Joana Coulon, Marina Bely. Effect of grape must saturation with carbon dioxide at the beginning of alcoholic fermentation: valorisation of species of interest. *Oeno 2015*, 10<sup>ème</sup> symposium International d'Oenologie de Bordeaux, France, 29 juin-1<sup>er</sup> juillet 2015.

Laura Chasseriaud, Cécile Miot-Sertier, Joana Coulon, Warren Albertin, Marina Bely. A new method for monitoring extracellular proteolytic activity of wine yeasts during alcoholic fermentation of grape must. *Oeno 2015*, 10<sup>ème</sup> symposium International d'Oenologie de Bordeaux, France, 29 juin-1<sup>er</sup> juillet 2015.

Laura Chasseriaud, Cécile Miot-Sertier, Joana Coulon, Warren Albertin, Marina Bely. Monitoring extracellular proteolytic activity of wine yeasts during alcoholic fermentation. *Food Micro*, Nantes, France, 1-4 Septembre 2014.

Warren Albertin, Laura Chasseriaud, Guillaume Comte, Aurélie Panfili, Adline Delcamp, Franck Salin, Philippe Marullo, Marina Bely. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. Levures Modèles et Outils, Bordeaux, France, 7-9 Avril 2014.

Laura Chasseriaud, Aurélie Vieillemard, Warren Albertin, Joana Coulon, Philippe Marullo, Marina Bely. Development of labeled *Saccharomyces cerevisiae* strains for monitoring mixed cultures throughout wine fermentation. 2<sup>nd</sup> International Conference on Microbial Diversity : Microbial Interaction in Complex Ecosystem, Turin, Italie, 23-25 Octobre 2013.

### **Communication orale en congrès internationaux**

Laura Chasseriaud, Joana Coulon, Marina Bely. Effect of grape must saturation with carbon dioxide at the beginning of alcoholic fermentation: valorisation of species of interest. Oeno 2015, 10<sup>ème</sup> symposium International d'Oenologie de Bordeaux, France, 29 juin-1<sup>er</sup> juillet 2015.